



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

GENE THERAPY AND CELL REPROGRAMMING IN MOUSE MODELS OF MONOGENIC HEMATOPOIETIC STEM CELL DISEASES

Memoria Presentada por FRANCISCO JAVIER MOLINA ESTÉVEZ para optar al grado de doctor por la Universidad Autónoma de Madrid, con mención europea.

Directores de tesis:

Guillermo Güenechea Amurrio

Juan A. Bueren Roncero

Francisco Javier Molina Estévez
TESIS DOCTORAL EUROPEA
2013

El trabajo de investigación descrito en esta memoria ha sido realizado en la División de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético (HIT) del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (**CIEMAT**) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (**CIBERER**), con la colaboración del Proyecto PERSIST del programa de Salud de la Union Europea, del Ministerio de Economía y Competitividad y de la Fundación Marcelino Botín para la Transferencia Tecnológica en el Campo de la Terapia Génica.

F.J.M.E. ha disfrutado de una ayuda para la formación de personal investigador CIEMAT y de un contrato con el CIBERER.

En primer lugar, quiero agradecer a los doctores Juan A. Bueren Roncero y Guillermo Güenechea Amurrio que me brindaran la oportunidad de formar parte del grupo de Terapias Innovadoras en el Sistema Hematopoyético. Pero sobre todo porque no hay día que no sienta que reafirman su confianza en mí en cada momento.

También agradezco el apoyo económico del CIEMAT que me concedió una beca FPI y del CIBERER que me contrató para poder dar término a los estudios de esta tesis.

I am in deep debt with Dr. Rafa Yáñez who allowed me to stay in his laboratory in the Royal Holloway University of London, which was one great experience pushing forward my molecular biology skills and triggering my interest in the Scid mouse model. In addition, I am thankful for the friendship of Hayder and many other scientists from the Wolfson.

I also want to acknowledge Dr. Manfred Schmidt who offered me the possibility to develop several steps of the molecular description of the integrome documented in this memory at his laboratory, in the NTC-DKFZ in Heidelberg. And I have to thank Ali, Raffo and the rest of the people I met there for the help and true companionship.

Y en castellano agradezco de corazón...

Especialmente a mis “niñas”: Afri y Mari Luz, porque habéis sido maestras, amigas, compañeras y tan cabezotas como yo, y eso siempre me ha tenido enamorado. Por no hablar de las palmeras de chocolate.

A los que ya tenían despacho de “grandes” en el siete: Bea, Jose Carlos, Maruja, JACO y Paula, porque siempre me han ayudado con su excelso conocimiento sin guardarse ni una coma. A pesar del salto de galones siempre me hacéis sentir muy cerca de vosotros, gracias.

A Elena, Aurora, Angelines, Sergio, Sole y Mamen, porque siempre que he necesitado algo, he conseguido además de lo que pedía una gran sonrisa.

A mis compañeros originales de mesa: Sergio y Miguel por compartir chascarrillos y curiosidades, y algún brindis.

Al resto del despachito: Rosa, M^aEugenia, Antonio, Óscar, Ariana, Alberto, Laura Cé, Laura Pé, Montse, Lara, Paula Busto... Cuánto ingenio reconcentrado en esa habitación: ¡Qué fácil es hacer piña con vosotros!

A los baticuevos originales: sobre todo a Néstor, por esa hoja de excel de origen alienígena que tanto me costó entender. A Su, por su dulzura. A Esther por su locura. A Hellen, mi salvavidas en Londres, gracias.

A Israel, por no contar a nadie que esos tubos que amanecieron en aguanieve en la primavera de 2007, los olvidé yo. Gracias amigo, ya no hace falta que guardes más el secreto. Rebe, espero no darte un disgusto así nunca.

A Meri, Sandra, Rocío, Álvaro, Zita y Elenita, gracias por ser un apoyo en este final de tesis.

A los brotes verdes del *labo* Vicky, Diego, María Micro, Bego, M^aJosé y José: sois estupendos no perdáis la ilusión. Vick seguro que acabaremos montando un “bisnes”.

Maribrilli (Raquel), gracias por tenerme al día de las tendencias en todo, pero sobre todo por las marineras.

A los nuevos “baticuevos”: María Grande, Mercedes, Miriam, Óscar Escribano, Nuria... De algunos he podido aprender mucho y de los más recientes estoy deseando aprender.

A esa rubia que es toda energía, sí, tú, Fati, tienes dentro y fuera del *labo* una energía que si no controlas explota, pero cuando la canalizas y sonríes da mucha luz y no solo en ciencia.

También ha sido un placer compartir poyata con estrellas fugaces como Mónica “proyecto sombra”, Sabine, Céline, Estrella, Clarita, Tommy, Mercedes (alias Mari Luz 2), Marisa y Omaira.

Gracias por los anticuerpos y consejos a “los Paramios”, “los Fernandos” y “las Marcelas” sobre todo a ese escaparate de científic@s de “olé”: Cloti, Cristina, Jose(la), Ague, Sara, Ariza, Olga, Blanca, Mónica, David, Ángel, Manuel, ... y también a Kiko y el resto de gente de Histología.

Muchas gracias a Teresa, Freddy, MariaJosé y Rosita, por mantener mi sitio en orden, aunque no siempre sea el orden que yo tenía en mente.

Y por supuesto, a los ratones sin los cuales esta tesis no habría podido existir, son los protagonistas reales... y a todos sus cuidadores, especialmente a Miguel Ángel, Edilia y Jesús y toda su tropa, vuestro trabajo es esencial.

Tengo también que agradecer a mis amigos de Getafe por ayudarme a mantener la cordura simplemente estando ahí y no discutiendo de ciencia (para algo en lo que os podría ganar...).

También a las personas que me han soportado más de cerca: en primer lugar mis padres, Javier y Lourdes, y mi hermana Noelia, no hace falta decirlo pero os quiero. Y también a mis flores: Belén e Inesita y Johana, por supuesto. A mi primera amiga: Celina y a mi Cris, Aida y Nora, vuestra amistad es muy importante para mí. Y a mi familia Bioquímica: Loli, Paula, Lara y Quique, sin vosotros no hubiese sido capaz ni de cerrar un supuesto práctico.

Esta es una tesis que desafía a la herencia clásica, mediante la transferencia horizontal de genes, y el curso natural de la vida, rejuveneciendo células hasta el punto de que pierden su identidad. Así, que tengo que agradecer todo ese legado que no sigue el dogma de la biología que he recibido de mis abuelos y sus hermanos, y que se basa en compartir experiencias y sentimientos sin ningún soporte físico por medio, gracias por vuestro cariño.

A Angelines,
por su ejemplo de lucha

A mis padres y hermana,
por su cariño

A Ángeles, Joaquina, Vicente, Andrés y Manuel,
diga lo que diga esta memoria,
el legado humano más importante no está en los genes

INDEX

I.- ABSTRACT	1
II.- ABBREVIATIONS	3
III.- INTRODUCCIÓN	5
1.- SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	5
1.1.- ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	5
1.2.- LA CÉLULA MADRE HEMATOPOYÉTICA	6
2.- ENFERMEDADES HEREDITARIAS RARAS ASOCIADAS A INESTABILIDAD GÉNÉTICA QUE AFECTAN AL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO	8
2.1.- LA ANEMIA DE FANCONI	9
2.1.1.- Manifestación fenotípica de la anemia de Fanconi	9
2.1.2.- La ruta de Fanconi	10
2.1.3.- Tratamientos disponibles y futuros	12
2.1.4.- Modelo de ratón para la anemia de Fanconi	12
2.2.- LA INMUNODEFICIENCIA COMBINADA GRAVE	14
2.2.1.- Manifestación fenotípica de la deficiencia en DNA-PKcs	14
2.2.2.- Proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs)	15
2.2.3.- Modelo de ratón Scid	16
3.- TERAPIA GÉNICA	17
3.1.- TRANSFERENCIA DE GENES TERAPÉUTICOS	18
3.2.- VECTORES LENTIVIRALES	19
3.3.- INTEGRACIÓN RETROVIRAL	20
3.4.- SEGURIDAD DE LOS VECTORES INTEGRATIVOS	21
3.4.1.- Modelos predictivos de genotoxicidad <i>in vitro</i>	22
3.4.2.- Modelos predictivos de genotoxicidad <i>in vivo</i>	22
3.4.3.- Recambio clonal y genotoxicidad <i>in vivo</i>	23
3.4.4.- Principales factores de riesgo	23
4.- TERAPIA GÉNICA DE LA ANEMIA DE FANCONI "A"	24
4.1.- ENSAYOS PREVIOS	24
4.2.- EL VECTOR LENTIVIRAL PROPUESTO PARA EL ENSAYO CLÍNICO FANCOLEN-1	24
5.- REPROGRAMACIÓN CELULAR	26
5.1.- CÉLULAS MADRE TOTI-, PLURI- Y MULTIPOTENTES	26
5.1.1.- Quiescencia y senescencia celular	26
5.2.- ALTERACIÓN DEL GRADO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	27
5.3.- LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS	27
5.3.1.- Aspectos a mejorar en la generación de iPSCs	28
5.3.2.- Perspectivas futuras de las iPSCs	28
5.3.3.- Las células iPS como modelo de estudio de enfermedad	29
IV.- OBJETIVOS	31
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	35
1.- ANIMALES	35
1.1.- CEPAS EMPLEADAS	35
1.1.1.- Ratones FVB <i>wild-type</i> y <i>Fanca</i> ^{-/-}	35
1.1.2.- Ratones BALB/c <i>wild-type</i> y Scid	35
1.1.3.- Ratones NSG	35
1.2.- EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	36
1.2.1.- Evaluación Hematológica	36
1.2.2.- Extracción de órganos hematopoyéticos	36
1.2.3.- Purificación y trasplante de células madre hematopoyéticas	37
1.2.4.- Extracción de fibroblastos embrionarios de ratón	38
2.- CULTIVOS CELULARES	38
2.1.- CULTIVO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS	38
2.2.- CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES	39
2.2.1.- Cultivo de líneas celulares	39
2.2.2.- Cultivo de células primarias	40
2.2.3.- Cultivo de células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas	40

3.- VECTORES	41
3.1.- AMPLIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS	41
3.1.1.- Transformación de bacterias.....	41
3.1.2.- Comprobación de los plásmidos	41
3.1.3.- Purificación de plásmidos para transfección de células eucariotas	42
3.2.- VECTORES RECOMBINANTES	42
3.2.1.- Producción de vectores virales	42
3.2.2.- Titulación de virus recombinantes	43
3.2.3.- Vectores γ -retrovirales.....	44
3.2.4.- Vectores lentivirales.....	44
3.3.-VECTORES NO VIRALES	46
3.3.1.- Transposones	46
4.- MODELO PRECLÍNICO DE TERAPIA GÉNICA EN RATONES <i>Fanca</i> ^{-/-}	46
4.1.- GENOTIPADO DE LOS RATONES <i>Fanca</i> ^{-/-}	46
4.2.- CORRECCIÓN GENÉTICA Y TRASPLANTE DE PROGENITORES <i>Fanca</i> ^{-/-}	46
4.2.1.- Transducción de progenitores lin ⁻	46
4.2.2.- Trasplante de progenitores modificados genéticamente	47
4.3.- EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VECTOR SIN-LV	
PGK <i>FANCA</i> <i>wPRE</i> ^{MUT}	48
4.3.1.- Seguimiento periódico de los ratones <i>Fanca</i> ^{-/-}	48
4.3.2.- Análisis a término.....	50
4.3.3.- Estudios complementarios.....	50
4.3.4.-Estudio del patrón de integración de <i>FANCA</i> -LV.....	51
5.- GENERACIÓN DE iPSCs DEFICIENTES EN DNA-PKcs.....	52
5.1.- CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Scid.....	52
5.1.1.- Genotipado de células obtenidas de ratones Scid	52
5.1.2.- Caracterización funcional de cultivos Scid	53
5.2.- Uso de vectores lentivirales de reprogramación celular	54
5.2.1.- Vectores SIN-LV escindibles para la generación de iPSCs	54
5.2.2.- Escisión del vector de LV-iPSC.....	55
5.3.- ESTRATEGIAS NO VIRALES DE REPROGRAMACIÓN CELULAR	55
5.3.1.- Transposones para la generación de iPSC.....	56
5.4.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES	56
5.4.1.- Selección de colonias de células reprogramadas.....	56
5.4.2.- Citometría de flujo	57
5.4.3.- Inmunohistoquímica	57
5.4.4.- Estudios genéticos.....	58
5.4.5.- Estudios de metilación de promotores	59
5.4.6.- Inducción de teratomas	60
5.5.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EN REPROGRAMACIÓN	60
5.5.1.- Capacidad de propagación <i>in vitro</i>	60
5.5.2.- Susceptibilidad a la manipulación genética de células Scid	60
5.5.3.- Ensayos de senescencia	60
5.5.4.- Expresión de proteínas de senescencia y envejecimiento celular	60
6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	61
VI.- RESULTS	63
1.- ANALYSIS OF THE SAFETY AND EFFICIENCY OF A LENTIVIRAL VECTOR FOR THE	
GENE THERAPY OF FA-A PATIENTS.....	63
1.1.- SHORT <i>EX VIVO</i> TRANSDUCTION WITH <i>FANCA</i> -LV CORRECTS THE PHENOTYPE OF	
MOUSE <i>Fanca</i> ^{-/-} HEMATOPOIETIC PROGENITORS WITH MINIMAL TOXICITY	63
1.2.- <i>FANCA</i> -LV PRESERVES LONG TERM REPOPULATING ABILITY OF PHENOTYPICALLY	
CORRECTED HEMATOPOIETIC STEM CELLS WITH LOW TOXICITY.....	65
1.2.1.- <i>FANCA</i> -LV corrected cells contribute to hematopoietic recovery of <i>Fanca</i> ^{-/-} recipients	65
1.2.2.- Absence of adverse effects of <i>FANCA</i> -LV transduced <i>Fanca</i> ^{-/-} HSCs after	
serial transplantation.....	67
1.2.3.- Sustained detection of the <i>FANCA</i> -LV in primary and secondary <i>Fanca</i> ^{-/-} recipients	68
1.2.4.- Biodistribution of <i>FANCA</i> -LV cells after serial transplantation	68

1.2.5.- <i>Fanca</i> ^{-/-} recipients engrafted with gene corrected cells display a healthy phenotype.....	69
1.3.- INSERTIONAL REPERTOIRE OF <i>FANCA</i> -LV UPON SERIAL TRANSPLANTATION IN <i>Fanca</i> ^{-/-} MICE UNCOVERS SIGHTS OF HEALTHY HEMATOPOIESIS	70
1.3.1.- High throughput analysis of LV and RV integration sites in transduced <i>Fanca</i> ^{-/-} cells.....	70
1.3.2.- Analysis of the insertional profile in hematopoietic samples from <i>Fanca</i> ^{-/-} mice transplanted with gene corrected syngeneic HSCs.....	72
1.3.3.- The analysis of the insertional profile defines clusters in <i>Fanca</i> ^{-/-} HSCs	73
1.3.4.- Ingenuity pathway analysis	73
1.3.5.- Clonal analyses of <i>FANCA</i> -LV transduced cells exhibit a healthy clonal HSC turnover in <i>Fanca</i> ^{-/-} recipients	74
1.3.6.- Clonal kinetics in <i>Fanca</i> ^{-/-} mice show a polyclonal repopulation pattern of corrected cells in contrast to the oligoclonal repopulation of <i>EGFP</i> -RV transduced HSCs	76
2.- GENERATION OF iPSC LINES FROM <i>Prkdc</i> ^{scid} SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENT MICE	83
2.1.- GENERATION OF WT iPSC CLONES WITH REPROGRAMMING LENTIVIRAL VECTORS	83
2.1.1.- STEMCCA reprogramming-LV.....	83
2.1.2.- Scid MEFs resistance to cell reprogramming.....	87
2.2.- DISECTING THE REPROGRAMMING REFRACTORY PROPERTIES OF DNA-PKcs DEFICIENT FIBROBLASTS.....	88
2.2.1.- Analyses of the telomere length of <i>Prkdc</i> ^{scid} MEFs.....	88
2.2.2.- Reprogramming-LVs promote <i>Prkdc</i> ^{scid} cell proliferation.....	89
2.2.3.- Reprogramming-LVs efficiently transduce Scid cells.....	90
2.3.- REPROGRAMMING TRANSPOSONS FACILITATE THE GENERATION OF DNA-PKcs DEFICIENT iPSCs WITH A CHARACTERISTIC RADIOSENSITIVE PHENOTYPE	91
2.3.1.- Optimizing nucleofection in <i>Prkdc</i> ^{scid} MEFs	92
2.3.2.- Reprogramming transposons efficiently generate wt and Scid iPSC colonies	92
2.3.3.- Differences in the molecular events induced by STEMCCA LV and T2/OSKM in <i>Prkdc</i> ^{scid} cells	93
2.3.4.- Scid Tn-iPSC match pluripotency standards	94
2.3.5.- <i>Prkdc</i> ^{scid} iPSCs exhibit a radiosensitive phenotype characteristic of NHEJ deficient cells ...	95
VII.- DISCUSSION.....	97
1.- PRECLINICAL EVALUATION OF <i>FANCA</i> -LV ON A MOUSE MODEL OF FA-A.....	97
2.- IMPAIRED CELL REPROGRAMMING OF CELLS WITH DEFECTIVE NHEJ DUE TO SCID MUTATION	101
VIII.- CONCLUSIONS	107
1.- PRECLINICAL EVALUATION OF THE EFFICACY AND THE SAFETY OF A PGK-FANCA-Wpre* LENTIVIRAL VECTOR (<i>FANCA</i> -LV) IN A MOUSE MODEL OF FANCONI ANEMIA-A	107
2.- ANALYSIS OF THE INVOLVEMENT OF THE <i>Prkdc</i> ^{scid} MUTATION IN CELL REPROGRAMMING	107
IX.- COROLLARY	109
X.- SUPPLEMENTAL INFORMATION	111
XI.- BIBLIOGRAPHY.....	119

I.- ABSTRACT

Fanconi anemia (FA) and *PRKDC* severe combined immunodeficiency (*PRKDC*-SCID) are inherited genetic diseases affecting different pathways responsible for DNA-damage signaling and repair. Fanconi anemia and *PRKDC*-SCID patients do not only exhibit an exacerbated sensitivity to DNA damaging agents, but also contain hematopoietic stem cells (HSCs) with defective proliferation and differentiation properties, resulting in bone marrow failure, in the case of FA patients, and severe immune defects, in *PRKDC*-SCID patients.

Herein, we investigated the efficacy and the safety of a self-inactivating (SIN) lentiviral vector harboring the *FANCA* gene (*FANCA*-LV) in a FA-A mouse model. The conditions for *FANCA*-LV transduction were optimized to minimize the *ex vivo* manipulation of *Fanca*^{-/-} bone marrow (BM) HSCs, while maintaining a high transduction efficiency. Corrected cells were transplanted into irradiated *Fanca*^{-/-} recipients, which were followed in the long-term. Thereafter, BM cells from primary recipients were serially transplanted to study the behavior of corrected HSCs capable of extensive repopulation. In these animals, analyses of vector copy number per cell, percentage of chimerism and sensitivity of transduced cells to inter-strand cross-linking drugs were conducted. Our results showed the efficient transduction and phenotype correction of true HSCs with the ability to generate a long-term engraftment of *Fanca*^{-/-} recipients over serial BM transplantation. The use of lineal amplification mediated (LAM) PCR of the insertion sites coupled with next generation sequencing (NGS) allowed us to characterize the integrome of the hematopoietic system in peripheral blood and BM samples corresponding to different recipients at multiple post-transplantation periods. The overall insertional profile and clonal kinetics of gene corrected *Fanca*^{-/-} HSCs showed a healthy polyclonal hematopoiesis in the transplanted recipients.

The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) is postulated as an unlimited source of cells for regenerative therapies of numerous diseases. However, several syndromes still remain to be investigated with respect to the feasibility of this approach. By the use of viral and non-viral reprogramming vectors, we have attempted for the first time the reprogramming of *Prkdc*^{scid} cells, deficient in the protein DNA-PKcs required for NHEJ.

In order to generate iPSCs from *Prkdc*^{scid} fibroblasts, cells were either transduced with a CRE/LoxP polycistronic reprogramming LV (STEMCCA) or co-transfected with a reprogramming Sleeping Beauty (SB) transposon (T2/OSKM) and the SB100X hyperactive transposase. In control fibroblasts, we demonstrated the efficiency of the STEMCCA reprogramming LV to generate iPSCs. On the other hand, we observed that the reprogramming of *Prkdc*^{scid} fibroblasts was markedly affected. However, we achieved the generation of *Prkdc*^{scid} iPSCs when a more efficient reprogramming SB transposon/transposase system was used. The characterization of cells

undergoing cell reprogramming with the LV showed that *Prkdc^{scid}* cells developed a senescent phenotype, with overexpression of *p16/INK^{4a}* blocking the reprogramming process. The reprogramming SB transposon did not trigger such a senescent response, and thus, permitted the isolation of *Prkdc^{scid}* iPSCs. Full description of *Prkdc^{scid}* iPSCs demonstrated that these clones conserved the parental *Prkdc^{scid}* mutation and the characteristic hypersensitivity to ionizing radiation as a consequence of their defect in NHEJ DNA repair.

Taken together, the results showed in this thesis evidence the efficiency and safety of the *FANCA*-LV, supporting its use for the gene therapy of FA-A patients. Besides, we also demonstrate the implications of the NHEJ DNA repair pathway in cell reprogramming. The use of highly efficient reprogramming SB transposons facilitated, however, the generation of *Prkdc^{scid}* iPSCs, which will constitute a valuable tool to understand the role of NHEJ in cell differentiation, and to test new anticancer drugs in a cell model hypersensitive to DNA damage.

II.- ABBREVIATIONS

	Español		English
ADNc	ADN complementario	cDNA	Copy DNA
AF	Anemia de Fanconi	FA	Fanconi Anemia
AP	Fosfatasa alcalina		Alkaline phosphatase
BMT	Trasplante de médula ósea		Bone marrow transplantation
CAG	Promotor sintético CMV- β -actina		CMV-chicken β -actin synthetic promoter
CD	Antígeno de diferenciación		Cluster of differentiation
CFC	Célula formadora de colonias		Colony forming cell
CFU	Unidad formadora de colonias		Colony forming unit
CFU-GM	Unidad formadora de colonias granulocíticas y macrofágicas		Colony forming unit granulocytic and macrophagic
CGD	Base de datos clínica del genoma		Clinical genome database
CMH	Célula madre hematopoyética	HSC	Hematopoietic stem cell
CpG	Citosina-fosfoguanina		Cytosine-phosphoguanine
HLA	Antígeno de histocompatibilidad leucocitaria		Histocompatibility Leukocyte Antigen
DDR	Respuesta a daño en el ADN		DNA-damage response
DEB	Diepoxibutano		Diepoxybutane
DNA-PK	Proteína quinasa dependiente de ADN		DNA-dependent protein kinase
DNA-PKcs	Subunidad catalítica de la DNA-PK		DNA-PK catalytic subunit
DSB	Rotura de doble hebra		Double strand breaks
EGFP	Proteína verde fluorescente		Green fluorescent protein
ESC	Célula madre embrionaria		Embryonic stem cell
FANCA	Gen humano de la anemia de Fanconi-A		Human Fanconi anemia-A gene
Fanca	Gen de ratón de la anemia de Fanconi-A		Mouse Fanconi anemia-A gene
GMP	Normas de correcta fabricación		Good manufacture practice standards
Gy	Gray		Gray
HR	Recombinación homóloga		Homologous recombination
ICL	Entrecruzamientos de ADN		Interstrand cross link
INT	Retrotranscriptasa/integrasa retroviral		Retroviral reverse transcriptase/integrase
iPSC	Célula madre pluripotente inducida		Induced pluripotent stem cell
IR	Radiación ionizante		Ionizing radiation
IRES	Sitio de unión a ribosomas		Internal ribosome entry site
LAM-PCR	PCR precedida de una amplificación lineal		Linear amplification-mediated PCR
lin⁻	Población negativa para marcadores maduros de linaje		Negative population for mature lineage markers
LIS	Sitio de integración del vector lentiviral		Lentiviral vector insertion site
LTR	Repeticiones terminales largas		Long terminal repeats
LV	Vector lentiviral		Lentiviral vector
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón		Mouse embryo fibroblasts
MMC	Mitomicina C		Mitomycin C
MLLV	Virus de la leucemia Moloney de ratón		Moloney murine leukemia virus
MO	Médula ósea	BM	Bone marrow
MOI	Multiplicidad de infección		Multiplicity of infection
NGS	Secuenciación masiva de nueva generación		Next-generation sequencing
NHEJ	Unión de extremos no homólogos		Non-homologous end joining
NSG	Cepa de ratones NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ		NOD.Cg-Prkdc ^{scid} Il2rg ^{tm1Wjl} /SzJ mouse strain
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa		Polimerase chain reaction
PGK	Fosfoglicerato quinasa		Phosphoglycerate kinase
Psi	Señal de encapsidación retroviral		Retroviral encapsidation signal
qPCR	PCR cuantitativa		Quantitative PCR
RIS	Sitios de integración del vector retroviral		Retroviral vector insertion site
RTCGD	Base de datos de cánceres originados por retrovirus y transposones		Retrovirus and transposon tagged cancer genome database

SB	Transposón sintético " <i>Bella durmiente</i> "		" <i>Sleeping Beauty</i> " synthetic transposon
SCID	Inmunodeficiencia combinada grave		Severe combined immunodeficiency
SCID-X1	SCID ligada al cromosoma X		X-chromosome linked SCID
SIN	Auto-inactivante		Self-inactivating
SN	Sobrenadante		Supernatant
SP	Sangre periférica	PB	Peripheral blood
SRC	Célula repobladora de ratones Scid		Scid repopulating cell
TA	Temperatura ambiente	RT	Room temperature
TSS	Sitio de inicio de la transcripción		Transcription start site
TU	Unidades de transducción		Transduction units
VCN	Número de copias del vector		Vector copy number
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana	HIV	Human immunodeficiency virus
VSV-G	Glicoproteína "G" de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular		"G" envelope glycoprotein from the vesicular stomatitis virus
wPRE	Secuencia de estabilización post-transcripcional del hepatovirus de marmota		Woodchuck hepatovirus post-transcriptional regulatory element
wt	Silvestre		Wild-type

III.- INTRODUCCIÓN

1.- SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

El sistema hematopoyético está formado por los tejidos que dan soporte a la generación, maduración y reciclaje de los componentes de la sangre, así como los órganos que acogen estas células fuera del torrente sanguíneo. Por tanto, el sistema hematopoyético comprende la sangre, la médula ósea (MO) y los tejidos extramedulares (timo, ganglios del sistema linfático).

1.1.- ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

El sistema hematopoyético es un sistema altamente jerarquizado en el que un número limitado de células madre soporta el mantenimiento de uno de los tejidos más dinámicos del cuerpo: la sangre. Además, bajo circunstancias especiales, estas mismas células pueden ayudar a regenerar otros tejidos distintos a la sangre, o formar parte de ellos, **figura 1**.

Ya en el embrión surge una hematopoyesis primitiva en el saco vitelino y en la región aorta-gónada-mesonefros (AGM) (Migliaccio et al., 1986; Medvinsky and Dzierzak, 1996; Sanchez et al., 1996). A continuación, va migrando al hígado fetal y al bazo, para establecerse definitivamente en la MO roja, revisado en (Orkin and Zon, 2008). En adultos sanos, la hematopoyesis es mantenida fundamentalmente por la MO roja, presente en huesos planos y en la epífisis de los huesos largos. En ratón, el bazo contribuye también de manera significativa a la generación de sangre (Till and Mc, 1961; Morrison et al., 1995).

La formación de nuevas células sanguíneas sigue una jerarquía piramidal, **figura 1**. En su vértice encontramos a la **célula madre hematopoyética** (CMH): el tipo celular más primitivo o indiferenciado del sistema. Entre sus cualidades destacan su baja tasa de proliferación, su división asimétrica y su multipotencia. Estos atributos permiten a la CMH tener una gran capacidad de auto-mantenimiento y de repoblación a largo plazo. Estas células sobreviven a lo largo de toda la vida del individuo y mantienen la hematopoyesis mediante la generación de toda la variedad de progenitores hematopoyéticos comprometidos, necesarios para dar lugar a una homeostasis sana.

Los **progenitores hematopoyéticos comprometidos** permanecen en los escalafones más próximos a las CMHs, **figura 1**. Son morfológicamente indistinguibles pero presentan diferencias respecto a sus predecesoras: tienen una gran capacidad de proliferación a expensas de poseer una limitada capacidad de automantenimiento. Además, el futuro tipo celular resultado de la maduración de su progenie, será homogéneo y está ya delimitado en este estadio (Metcalf, 1989). Los ensayos clonogénicos definen *in vitro* estos progenitores. Al ser estimulados por ciertos factores solubles, los progenitores forman colonias de células con una morfología característica (Martin et al., 1970; Morrison et al., 1995). Cabe destacar los siguientes tipos de progenitores o precursores:

- Progenitores eritroides primitivos, definidos como unidades formadoras de *burst* eritroides o BFU-E (del inglés *Burst Forming Unit-Erythroid*) (Gregory and Eaves, 1978).
- Precursores gránulo-macrofágicos, definidos como unidades formadoras de colonias granulocíticas y macrofágicas o CFU-GM (del inglés *Colony Forming Unit-Granulocytic and Macrophagic*) (Pluznik and Sachs, 1965; Bradley and Metcalf, 1966).
- Precursores megacariocíticos, definidos como unidades formadoras de colonias megacariocíticas o CFU-Meg (del inglés *Colony Forming Unit-Megakaryocytic*) (Metcalf et al., 1975; McLeod et al., 1976; Nakeff and Daniels-McQueen, 1976).

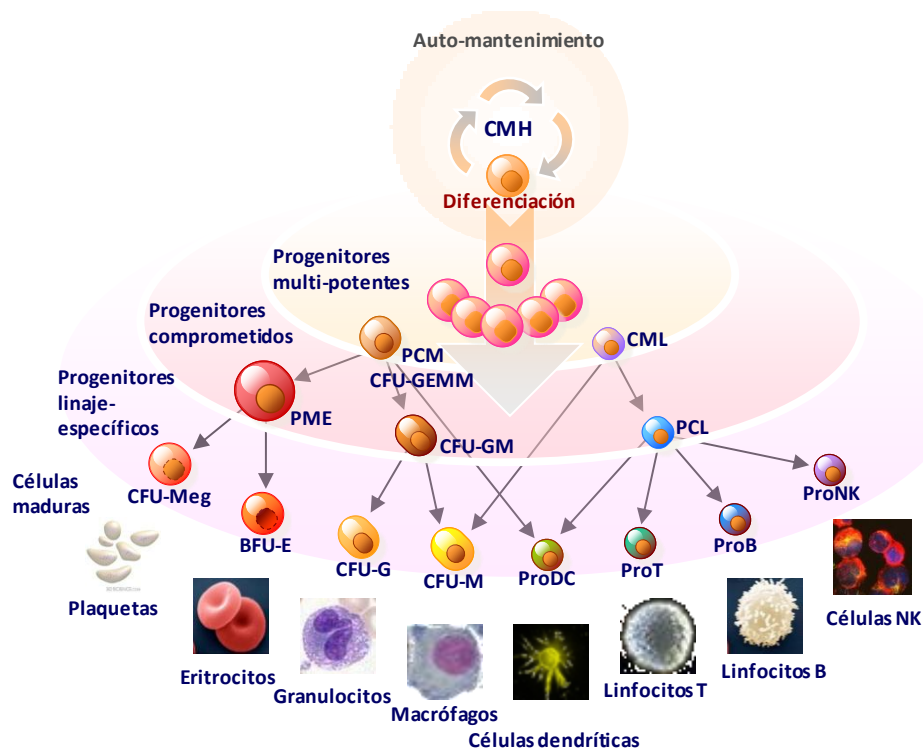


Figura 1.- Organización jerárquica del sistema hematopoyético. CMH, Célula madre hematopoyética; PCM, Progenitor común mieloide / CFU-GEMM, Unidad formadora de colonias granulocíticas, eritroides, megacariocíticas y macrofágicas; CML, Célula madre linfóide; PME, Progenitor megacariocítico-eritroide; CFU-GM, Unidad formadora de colonias granulocíticas y macrofágicas; PCL, Progenitor común linfóide; CFU-Meg, Unidad formadora de colonias megacariocíticas; BFU, Unidad formadora de "Burst" eritroides; CFU-G, Unidad formadora de colonias granulocíticas; CFU-M, Unidad formadora de colonias macrofágicas; Pro-DC, Precursor de células dendríticas; ProT, Pro-linfocito T; ProB, Pro-linfocito B; ProNK, pro-linfocito citotóxico natural.

Por debajo de los progenitores se encuentran las **células maduras**, de morfología reconocible, **figura 1**. Son claramente el compartimento más numeroso y que sufre un mayor desgaste. Aquí se engloban desde células con tal grado de especialización que han perdido orgánulos tan críticos como el núcleo (p.ej., eritrocitos y plaquetas) hasta células aún por terminar de diferenciarse (p.ej., pro linfocitos).

1.2.- LA CÉLULA MADRE HEMATOPOYÉTICA

La MO posee una gran variedad de tipos celulares entre los cuales, las **CMHs** representan sólo una pequeña fracción, en torno al **0,01%** de las células de la MO (Jones et al., 1990). En muchos mamíferos, pero no en todos, la cifra total de CMHs se conserva entre 16.800 y 81.000 según los distintos autores (Abkowitz et al., 2002; Gordon et al., 2002). Inicialmente se pensó que la población de CMHs quedaba definida por las **unidades formadoras de colonias esplénicas** (CFU-S, del inglés *Colony Forming Unit-Spleenic*). También se sugirió que las **células formadoras de áreas de empedrado** (CAFC, del inglés *Cobblestone Area Forming Cell*) (Ploemacher et al., 1989) y las **células iniciadoras de cultivos de larga duración in vitro** (LTC-IC, del inglés *Long Term Culture-Initiating Cell*) (Lemieux et al., 1995) podrían acotar las poblaciones más primitivas. En paralelo, se desarrollaron ensayos funcionales *in vivo* que caracterizaban más eficazmente a la CMH más primitiva. El ensayo más utilizado es el de **re población competitiva** que se basa en inocular, en un animal sometido a quimio- o radioterapia mieloablativa, una mezcla de células congénicas para evaluar cuál de las dos contribuye en mayor medida a regenerar la hematopoyesis del individuo

“desplazando” a la otra. Los análisis pueden centrarse en la detección de marcadores cromosómicos o de polimorfismos. El método más extendido es el empleo de ratones con variaciones en el marcador panleucocitario Ly-5 (CD45), con dos variantes alélicas: Ly-5.1 y Ly-5.2 (CD45.1 y CD45.2, respectivamente), que pueden ser fácilmente reconocidas por anticuerpos monoclonales específicos (Maggio-Price et al., 1988; Laterveer et al., 1995; Varas et al., 1996).

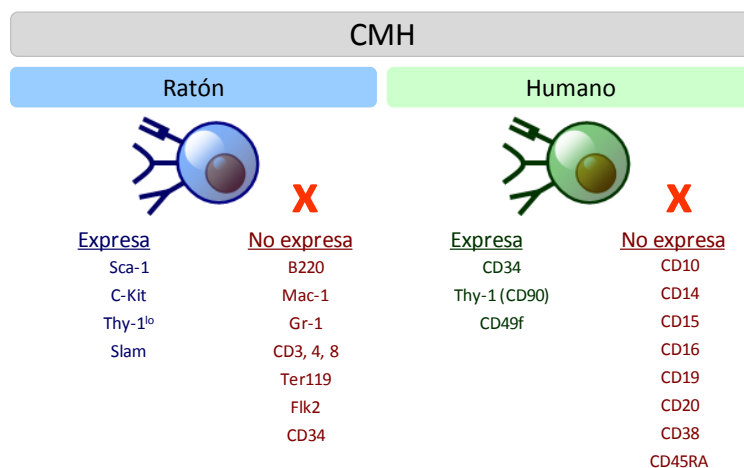


Figura 2.- Principales marcadores fenotípicos de las células madre hematopoyéticas (CMHs). Los marcadores expresados por las CMH se relacionan con su condición multipotente. En ratón, los marcadores fenotípicos no expresados son típicamente expresados por progenitores comprometidos (Flk2) y células hematopoyéticas maduras: linfocitos B (B220), linfocitos T (CD3, CD4, CD8), monocitos (Mac-1), macrófagos (Mac-1, Gr-1), mastocitos (CD34) y eritrocitos (Ter119). Análogamente los CDs (*cluster of differentiation*) ausentes en las CMH humanas sí se expresan en células hematopoyéticas maduras o en proceso de maduración: linfocitos B (CD15, CD19, CD20, CD38), linfocitos T (CD10, CD38, CD45RA-*naïve*), macrófagos (CD14, CD16) y células NK (CD16).

Los progenitores hematopoyéticos de ratón se caracterizan por tener capacidad de repoblación a corto y largo plazo. Son una población celular que se denomina **lin⁻**, porque no presentan los antígenos típicamente empleados para caracterizar en sangre periférica las poblaciones eritroide, monocítica, granulocítica o linfoide. Las CMHs de ratón sí expresan los marcadores Ly6A (*Stem-cell antigen 1*, Sca 1) y c-Kit, por lo que frecuentemente son llamadas **LSK** (**lin⁻, Sca1⁺ y c-Kit⁺**), **figura 2**. La población LSK supone tan solo un 0,5% de la MO (Morrison et al., 1995), sin embargo, sólo 100 células LSK son suficientes para repoblar todos los linajes de un ratón a largo plazo (Jordan and Lemischka, 1990). Estas células se caracterizan por su baja tasa metabólica, así pueden ser enriquecidas seleccionando células con baja actividad mitocondrial ya que se tiñen débilmente con rhodamina 123 (**poblaciones Rho^{low}**) (Visser et al., 1984). Además, se encuentran en su mayoría quiescentes por lo que presentan una señal muy baja del marcador de ADN Hoechst 33342 (**población SP, side population**) (Bunting and Hawley, 2002; Goodell et al., 2005).

Para definir las CMHs humanas se recurre con frecuencia a modelos de xenotrasplante en los que células hematopoyéticas humanas se trasplantan en ratones inmunodeficientes. Las células humanas con capacidad de reconstituir la hematopoyesis en ratones Scid contribuyendo al menos 2 linajes son llamadas **SRC** (Kamel-Reid and Dick, 1988; McCune et al., 1988) (del inglés **Scid Repopulating Cells**) y desde el principio se constató la importancia del marcador CD34 (Civin et al., 1996; Larochelle et al., 1996). Posteriormente se vió que otros marcadores podían acotar aún más esta población con capacidad SRC: **CD34⁺CD38⁻** y **lin⁻CD34⁺CD38⁻** (Bhatia et al., 1998), pudiendo ser estas últimas más primitivas que las CD34⁺CD38⁻, **figura 2**. Una disección más minuciosa de las fracciones celulares con capacidad SRC identificaron dos poblaciones de CMH:

con capacidad de **repoplación a corto (ST-SRC, Short Term Scid Repopulating Cells)** y **largo plazo (LT-SRC, Long Term Scid Repopulating Cells)** (Guenechea et al., 2001).

Aunque se asume que el cometido fundamental de las células madre adultas es dar soporte a un tejido en concreto, este punto de vista se ha puesto en entredicho por publicaciones que afirman que la multipotencia de las CMH supera las barreras de su propio tejido. Así, las CMHs de tejidos adultos podrían contribuir a formar músculo esquelético (Gussoni et al., 1999; Jackson et al., 1999), músculo cardíaco (Jackson et al., 2001), hígado (Petersen et al., 1999; Lagasse et al., 2000; Theise et al., 2000) o tejido epitelial (Krause et al., 2001). Si bien la transdiferenciación es un tema controvertido que pudiera ser consecuencia de fusiones celulares (Terada et al., 2002; Ying et al., 2002; Quintana-Bustamante et al., 2012) y que, en cualquier caso, ocurre con muy baja frecuencia o bajo circunstancias extraordinarias.

En determinadas afecciones la cantidad o calidad de estas CMHs puede verse mermada. Es por esto que cobra importancia la búsqueda de nuevas fuentes artificiales de CMHs para poder modelar o tratar terapéuticamente estas enfermedades. Una de las primeras fuentes alternativas propuestas han sido las **células madre embrionarias o ESCs** (del inglés *Embryonic Stem Cells*) (Nakano et al., 1994; Palacios et al., 1995) por su carácter totipotente. En la actualidad, el desarrollo de las **células madre pluripotentes inducidas o iPSCs** (del inglés *induced Pluripotent Stem Cells*), con menores implicaciones éticas y la posibilidad de ser generadas de forma específica para cada paciente (Raya et al., 2009), ha generado nuevas expectativas en esta búsqueda.

2.- ENFERMEDADES HEREDITARIAS RARAS ASOCIADAS A INESTABILIDAD GÉNÉTICA QUE AFECTAN AL SISTEMA HEMATOPOYÉTICO

Por lo general se define como **enfermedad rara** aquella que se presenta con una prevalencia igual o menor a 5 casos por cada 10.000 habitantes. A pesar de esta baja presencia, al existir más de 5.000 enfermedades raras (Forman et al., 2012), se cree que en suma afectan a entre un seis y un ocho por ciento de la población.

El registro de Orphanet, portal de referencia sobre enfermedades raras y medicamentos huérfanos (www.orphanet.net), constata 111 entradas asociadas a anemias y 85 asociadas a inmunodeficiencias, de las cuales 15 enfermedades raras pertenecen al grupo de las inmunodeficiencias combinadas graves (**SCID**, del inglés *Severe Combined Immunodeficiency*).

Desde hace años, nuestro grupo del CIEMAT/CIBERER ha mostrado un gran compromiso con la enfermedad de la **anemia de Fanconi (AF, ORPHA84)**, una enfermedad rara hereditaria. A veces se relaciona con otros síndromes como **Bloom, Ataxia telangiectasia, Diamond Blackfan y Cockayne**. Todos ellos muestran una cierta desprotección frente a agentes que generan inestabilidad genómica y predisposición al cáncer (Arlett and Lehmann, 1978). En el caso de la AF, la alteración que origina la enfermedad se manifiesta con grave repercusión en el compartimento de CMHs, afectando a la hematopoyesis del paciente.

Por otro lado, la **deficiencia en la DNA-PKcs** produce una inmunodeficiencia combinada grave radiosensible con ausencia de células T y B (**T^BSCID**). Es también una enfermedad rara, con tan solo 2 pacientes descritos a día de hoy (van der Burg et al., 2009; Woodbine et al., 2013). Otras enfermedades genéticas que originan un cuadro SCID radiosensible presentes en Orphanet son las deficiencias en **RAG1, RAG2, LIG4, NHEJ1 y DCLRE1C**. El mal funcionamiento de la DNA-PKcs durante la reparación de roturas de doble hebra en el ADN (DSB), que afecta al nicho de las CMH y a su diferenciación. La mutación en *Prkdc*, gen que codifica para la DNA-PKcs, es además la base

de un **modelo de ratón** que nos sirve como herramienta y modelo de investigación para ésta y otras enfermedades.

2.1.- LA ANEMIA DE FANCONI

El pediatra **Guido Fanconi** describió en el año 1927 el caso de tres hermanos aquejados de un tipo de anemia perniciosa familiar, conocida hoy como anemia de Fanconi (AF) (Fanconi, 1927). Esta enfermedad hereditaria se presenta en varias formas recesivas y también se conoce una variante ligada al cromosoma X, **tabla 1**. Se cataloga dentro de las enfermedades raras ya que afecta a cerca de 1-3 por 1.000.000 de habitantes, con una frecuencia de portadores estimada en 1 por cada 200-300 habitantes (Casado et al., 2007). Es importante reseñar que en España el grupo de complementación “A” supone cerca del 80% de los casos. Más aún, en la población de la etnia gitana española el 100% de los pacientes presentan una mutación en el gen FANCA, con una frecuencia de portadores de una mutación característica en el 4º exón que alcanza 1/60 (Callen et al., 2005). En Estados Unidos el porcentaje de casos Fanconi “C” es mayor que en Europa (Kennedy and D'Andrea, 2005; Wang, 2007; Shimamura and Alter, 2010), llegando incluso a alcanzar una frecuencia de portadores de 1/88 en algunas comunidades, como los judíos asquenazíes (Rosenberg, Tamary, and Alter, 2011).

2.1.1.- Manifestación fenotípica de la anemia de Fanconi

La AF se manifiesta con **anomalías congénitas** (polidactilia, manchas color café y otras malformaciones), anemia por **fallo de la médula ósea** y **predisposición al cáncer** (D'Andrea and Grompe, 1997; Tischkowitz and Dokal, 2004; Auerbach, 2009).

Las alteraciones en la estructura ósea evidentes al nacimiento, incluyendo el número de dígitos, son normalmente intervenidas quirúrgicamente en las primeras semanas de vida. El fallo de la MO se manifiesta durante los primeros 7 años de vida siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes de AF (Butturini et al., 1994). Las mejoras en los cuidados y calidad de vida han podido permitir el incremento en la longevidad de los pacientes, lo que ha evidenciado una predisposición al cáncer con una edad media de detección de la primera displasia en torno a los 20 años, revisado por Valeri y col. (Valeri et al., 2011). Los cánceres con mayor incidencia dentro de los pacientes de AF son la leucemia mieloide aguda y el carcinoma escamoso (Kee and D'Andrea, 2012).

La identificación de un paciente de AF suele empezar cuando la existencia de antecedentes familiares, malformaciones congénitas, episodios repetidos de anemia o infecciones recurrentes generan la sospecha en el pediatra. En estos casos se recurre a un *test* de roturas cromosómicas. Las células de los pacientes de AF presentan una elevada inestabilidad cromosómica que se emplea como prueba diagnóstica mediante la exposición de células primarias a agentes entrecruzantes del ADN como el diepoxibutano (**DEB**) o la mitomicina-C (**MMC**). Tras la exposición a DEB o MMC se realiza un estudio de roturas y otras anomalías cromosómicas. También resulta informativo para el diagnóstico la determinación de la parada del ciclo celular en la fase G2-M de células tratadas con estos agentes, así como la reducida viabilidad de las células formadoras de colonias (CFCs) en presencia de estos agentes genotóxicos. Cabe destacar que el empleo de las metodologías de secuenciación masiva como la NGS (*next-generation sequencing*) está cambiando los protocolos para el diagnóstico de AF y de otras enfermedades hereditarias (Chandrasekharappa et al., 2013).

2.1.2.- La ruta de Fanconi

El síndrome está causado por la falta o mal funcionamiento de alguna de las proteínas AF correspondientes a los 16 grupos de complementación descritos en AF.

Tabla 1.- Genes que pertenecen a la ruta de Fanconi.

Subtipo	%	Gen	Locus	kDa	Función de la proteína	Ub-D2/I*	Refs.
FA-A	66	<i>FANCA</i>	16q24.3	163	Miembro del <i>complejo 1</i> . Es fosforilada por ATR en la Serina 1449. Presenta 2 NLS.	Sí	(FA-consortium and consortium, 1996; Lo Ten Foe et al., 1996)
FA-B	~2	<i>FANCB</i>	Xp22.31	95	Miembro del <i>complejo 1</i> . Presenta un NLS.	Sí	(Meetei et al., 2004)
FA-C	10	<i>FANCC</i>	9q22.3	63	Se localiza en el núcleo y el citoplasma. Miembro del <i>complejo 1</i> , además de otras funciones independientes.	Sí	(Strathdee et al., 1992)
FA-D1	~2	<i>BRCA2</i>	13q12-13	380	Esencial en HR actúa sobre RAD51. Interacciona con FANCG, <i>FANCD2</i> , PALB2. Gen de susceptibilidad al cáncer.	No	(Howlett et al., 2002)
FA-D2	~2	<i>FANCD2</i>	3q25.3	155.162	Sustrato de monoubiquitinización por el <i>complejo 1</i> AF y de fosforilación por ATR, y probablemente por ATM en respuesta a daño en el ADN.	Sí	(Timmers et al., 2001)
FA-E	~2	<i>FANCE</i>	6p21-22	60	Miembro del <i>complejo 1</i> . Se une directamente a FANCD2. Presenta 2 NLS.	Sí	(de Winter et al., 2000a)
FA-F	~2	<i>FANCF</i>	11p15	42	Proteína adaptadora necesaria para el ensamblaje del <i>complejo 1</i> AF.	Sí	(de Winter et al., 2000b)
FA-G	9	<i>FANCG</i> <i>XRCC9</i>	9p13	68	Se localiza en el <i>complejo 1</i> y además interviene en HR mediante interacción con FANCD1, <i>FANCD2</i> y XRCC3.	Sí	(de Winter et al., 1998)
FA-I	~2	<i>FANCI</i>	15q25-26	140.147	Sustrato de monoubiquitinización dependiente de FANCD2 por el <i>complejo 1</i> AF y de fosforilación en respuesta a daño en el ADN.	Sí	(Dorsman et al., 2007)
FA-J	~0,2	<i>FANCI</i> <i>BRIP1</i>	17q22-24	140	Capacidad ATPasa dependiente de Y y helicasa 5'-3' DNA. Se une directamente el dominio BCRT de BRCA1. Gen de susceptibilidad al cáncer.	No	(Levitov et al., 2005)
FA-L	~0,2	<i>FANCL</i> <i>PHF9</i>	2p16.1	43	Miembro del <i>complejo 1</i> con actividad ubiquitina ligasa.	Sí	(Meetei et al., 2003)
FA-M	~0,2	<i>FANCM</i> <i>HEF</i>	14q21.3	250	Miembro del <i>complejo 1</i> con un dominio endonucleasa y actividad de translocación. Sensor de daño en el Y responsable de movilizar el complejo <i>complejo 1</i> AF al ADN.	Sí	(Meetei et al., 2005)
FA-N	~2	<i>FANCN</i> <i>PALB2</i>	16p12.1	140	Acompaña y localiza BRCA2. Puede unirse a las proteínas BRCA2 y BRCA1. Gen de susceptibilidad al cáncer.	No	(Reid et al., 2006)
FA-O	~0,2	<i>RAD51C</i>	17q22	43	Participa en varios complejos involucrados en HR. Gen de susceptibilidad al cáncer.	No	(Vaz et al., 2010)
FA-P	~0,2	<i>SLX4</i>	16p13.3	200	Proteína de anclaje para las nucleasas MUS81-EME1 y XPF-ERCC1. Participa en la resolución de intermedios de HR como son las uniones de Holliday.	No	(Kim et al., 2011b)
FA-Q	NA	<i>ERCC4</i> <i>(XPF)</i>	16p13.12	100	Proteína nucleasa responsable del corte en 5' durante la reparación del ADN.	No	(Bogliolo et al., 2013)

NLS; Señal de localización nuclear. HR; Recombinación homóloga.* Proteínas necesarias para la activación del complejo FANCD2/I. Ub, Ubiquitina.

Los genes suelen designarse como “**FANC**” seguido de la letra correspondiente al grupo de complementación, **tabla 1**. También se conocen proteínas asociadas a la ruta, a la espera de encontrar su implicación en pacientes con AF que justifiquen su inclusión como proteínas AF. Las proteínas asociadas se denominan con el prefijo FAAP (del inglés, *Fanconi Anemia Associated Protein*) seguido de su peso molecular (p.ej. FAAP120). Todas estas proteínas cooperan en una ruta de reparación del ADN que se activa durante su replicación en respuesta a modificaciones químicas en la doble hebra de ADN, principalmente entrecruzamientos del ADN (ICLs). Estas uniones hacen que la horquilla de replicación no pueda avanzar y quede bloqueada, activando entonces la ruta AF. Tras producirse primero el reconocimiento de la lesión, se desencadena la señalización oportuna y finalmente la remodelación (que implica corte de las hebras, eliminación de la alteración, síntesis y unión de extremos). Un esquema simplificado de este proceso se presenta en la **figura 3**.

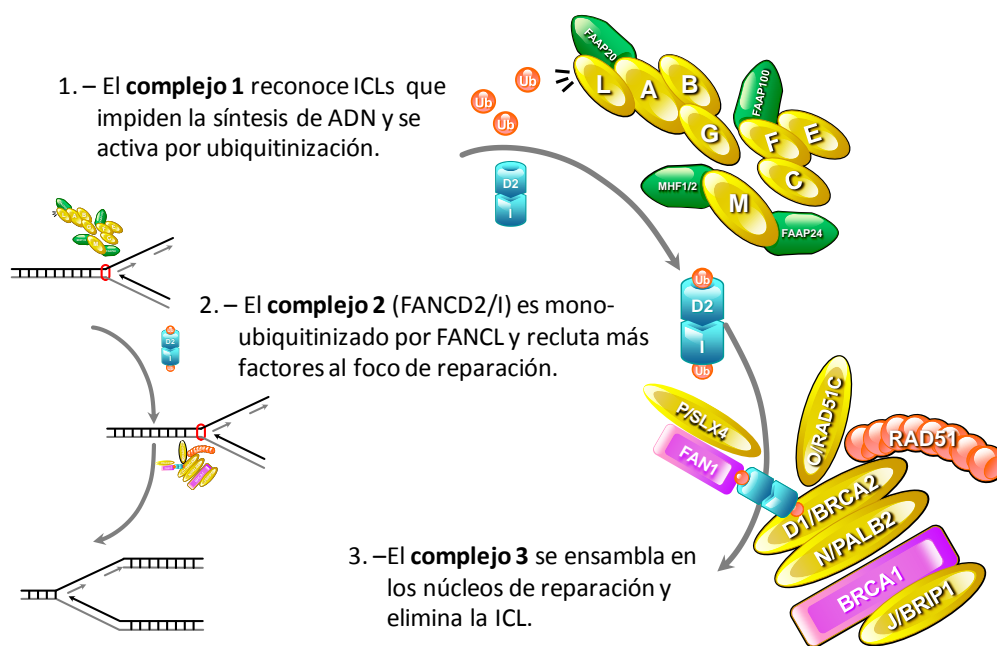


Figura 3.- Vista secuencial de la ruta de Fanconi. 1.- Las proteínas del **complejo 1** o *core* (FANCA, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -L, -M, MHF1/2, FAAP20, FAAP24 y FAAP100) se activan por la presencia de ICLs que impiden el avance de la horquilla de replicación. 2.- Seguidamente, el **complejo 2** (FANCD2/I) es activado mediante monoubiquitinización por FANCL en el complejo 1. 3.- Finalmente FANCD2/I monoubiquitinizado es capaz de reclutar a las proteínas del **complejo 3** efector (FANCD1, -J, N, O, P, BRCA1, FAN1 y RAD51) que formarán focos de reparación. Tras la reparación de la lesión, la síntesis de ADN puede seguir normalmente. ICL, Entrecruzamientos de doble hebra. Ub, Ubiquitina.

Básicamente, los pasos son realizados por la asociación de las distintas proteínas AF en tres complejos: **complejo 1** (sensor o *core*) que tiene la capacidad de modificar mediante monoubiquitinización a las proteínas del siguiente **complejo 2** (el tándem FANCD2/I) que va a ser el encargado de reclutar y activar la maquinaria de reparación formando *foci* de reparación, en los que también participa el **complejo 3** (efector) en el que se ensamblan proteínas de AF junto con otras proteínas de reparación.

El fallo de un solo componente de la ruta de AF rompe la cadena de eventos necesarios para una correcta reparación del daño. La administración de los distintos genes *in vitro* permite determinar qué gen complementa el defecto en la ruta AF y así definir distintos grupos de complementación dentro de los pacientes de AF.

2.1.3.- Tratamientos disponibles y futuros

Actualmente, el único tratamiento efectivo del problema hematológico de estos pacientes es el **trasplante hematopoyético** a partir de un donante sano (Guardiola et al., 2000; Wagner et al., 2007). La ausencia de un donante compatible implica un mal pronóstico en la mayoría de los casos (MacMillan et al., 2010). La **selección pre-implantacional de embriones** sanos HLA idénticos, a pesar de que en ocasiones ha ayudado a encontrar un donante adecuado, presenta ciertos inconvenientes. Las parejas que pueden acceder a este proceso tienen que cumplir unos requisitos muy estrictos y además el tratamiento es costoso, lento y poco eficiente (Bielorai et al., 2004; Grewal et al., 2004; Verlinsky et al., 2004). También existen evidencias de que la **administración de andrógenos** a pacientes pudiera ayudar a prevenir el fallo de MO (Scheckenbach et al., 2012). Pero resulta un punto controvertido dada la incidencia de cáncer de hígado que en ocasiones se ha asociado a estos fármacos (Velazquez and Alter, 2004).

En determinados casos se han observado pacientes en los que se han detectado nuevas mutaciones espontáneas que han revertido la mutación original en algún progenitor de la MO. Aunque la frecuencia de esta reversión es baja, la ventaja proliferativa de estos progenitores impulsa la selección y amplificación del clon generado (Gross et al., 2002). Los pacientes que han sufrido una reversión de la mutación en el sistema hematopoyético, se denominan **pacientes mosaico**. La existencia de hasta un 15% de pacientes AF mosaico (Casado et al., 2007) sustenta la idea de que la corrección “artificial” del defecto génico en un pequeño número de CMHs podría extenderse a toda la hematopoyesis generada por las CMHs corregidas. Por ello, el trasplante autólogo de CMHs corregidas mediante técnicas de **terapia génica** podría suponer una alternativa terapéutica novedosa para pacientes con AF (Liu et al., 1999; Gush et al., 2000; Kelly et al., 2007).

Aunque la corrección fenotípica de células de pacientes mediante el empleo de técnicas de transferencia génica ha demostrado ser efectiva *in vitro* (Casado et al., 2007; Jacome et al., 2009; Gonzalez-Murillo et al., 2010), los primeros ensayos clínicos de terapia génica no tuvieron éxito, pues los progenitores corregidos no pudieron establecer un nivel de injerto significativo (Liu et al., 1997; Liu et al., 1999). Este problema también se ha visto reflejado en los intentos fallidos para reconstituir ratones inmunodeficientes NSG con células corregidas de pacientes de AF (Cohen-Haguenauer et al., 2006; Muller et al., 2012). Sólo recientemente se ha publicado la reconstitución de ratones NSG a partir de progenitores CD34⁺ de donantes sanos en los que se había interferido post-transcripcionalmente la expresión de proteínas AF (Baños et al., 2011; Ceccaldi et al., 2012).

Actualmente, se cree que mediante protocolos optimizados de terapia génica se podría resolver eficazmente el problema hematológico en pacientes de AF (Tolar et al., 2011; Tolar et al., 2012). Nuestro laboratorio consiguió recientemente la denominación de **medicamento huérfano** para un vector lentiviral (LV) denominado **SIN-LV PGK FANCA wPRE^{mut}** (EU/3/10/822), desarrollado para paliar los problemas hematológicos de pacientes de AF del grupo de complementación A (Gonzalez-Murillo et al., 2010). Además, ya se han autorizado dos ensayos clínicos en fase I/II: el primero para la colecta de células CD34⁺ de pacientes AF (“FANCOSTEM”, EudraCT: 2011-006197-88) y el segundo para su posterior corrección genética e inoculación en el momento del fallo de MO (“FANCOLEN-1” EudraCT: 2011-006100-12).

2.1.4.- Modelo de ratón para la anemia de Fanconi

A **falta de modelos humanizados** de la enfermedad, los modelos animales que reproducen la enfermedad, **tabla 2**, se han convertido en una herramienta esencial para el avance en la

investigación en la AF.

Tabla 2.- Modelos animales de anemia de Fanconi.

Gen	Mutación	Fenotipo	Cepa	Referencia
<i>Fanca</i>	Reemplazo Ex4-Ex7 por <i>neo</i> .	Apariencia normal, sin anomalías hematológicas importantes.	Mezcla 129/Ola y C57BL/6	(Cheng et al., 2000)
	Reemplazo del Ex37 por <i>neo</i> .	Sin anemia, reducción en CFU-GM a edad avanzada (6-8 meses).	129/S4 y C57BL/6	(Noll et al., 2002)
	Reemplazo de los Ex1-Ex6 por <i>lacZ</i> .	Retraso en el crecimiento, microftalmia, reducción de las células germinales primordiales en E11.5, incidencia de tumores.	C57BL/6	(Wong et al., 2003)
<i>Fancc</i>	Reemplazo del Ex8 por <i>neo</i> .	Retraso en el crecimiento, microftalmia y cataratas.	Mezcla 129/Sv y C57BL/6	(Chen et al., 1996)
	Reemplazo del Ex9 por <i>neo</i> .	Hematología normal, hipersensibilidad sanguínea a IFN- γ , reducción de CFU-GMs a edad avanzada (6 m).	Mezcla 129/Sv y C57BL/6	(Whitney et al., 1996)
<i>Fancd1</i>	Varias.	Ver referencias.	Varias	(Evers and Jonkers, 2006)
<i>Fancd2</i>	Reemplazo del Ex6 y Ex27 por <i>neo</i> .	Retraso en el crecimiento, microftalmia (C57BL/6J), elevada incidencia de tumores epiteliales (129/S4 y fondo mixto).	129/S4 y C57BL/6J	(Houghtaling et al., 2003)
	Reemplazo del In1 por <i>puro</i> mediante <i>gene trap</i> .	Contenido en CMH reducido.	C57BL/6J	(Parmar et al., 2010)
<i>Fancf</i>	Reemplazo del Ex1 por <i>neo</i> .	Elevada incidencia de cáncer, destacando tumores de células granulosas.	Mezcla 129/Ola y FVB	(Bakker et al., 2009)
<i>Fancg</i>	Reemplazo de Ex2-Ex9 por <i>neo</i> .	Hematología y apariencia normal, esplenocitos sensibles a IR.	Mezcla 129/Sv y C57BL/6	(Yang et al., 2001)
	Reemplazo de Ex1-Ex4 por <i>hyg</i> .	Hematología y apariencia normal, sin sensibilidad a IR en MEFs.	Mezcla 129/Ola y FVB	(Koomen et al., 2002)
<i>Fanci</i>	Reemplazo de 150 kb en el Cr11, incluyendo Ex4-Ex14, por el gen de la globina de cabra.	Reducción del peso de los embriones. Letal embrionario en cepa 129/Sv pura y (129/SvxB6)F1.	129/Sv y C57BL/6	(AgoulNIK et al., 2002)
<i>Fancm</i>	Reemplazo del Ex2 por loxP <i>neo</i> y escisión de <i>neo</i> .	Supervivencia limitada y elevada incidencia de cáncer. Baja proporción de hembras homocigotas.	Mezcla FVB y C57BL/6	(Bakker et al., 2009)
<i>Fancn</i>	Reemplazo del In1 por <i>-geo</i> mediante <i>gene trap</i> .	Letal embrionario. Heterozigotos sin fenotipo diferencial.	Mezcla 129/Ola y C57BL/6N; Mezcla 129/FVB	(Rantakari et al., 2010; Bouwman et al., 2011)
<i>Fanco</i>	Reemplazo del Ex2-3 por loxP <i>neo</i> y escisión de <i>neo</i> .	Letal embrionario en ratones null, mutación hipomórfica con desarrollo normal.	Rad51C- Mezcla 129/Sv y C57BL/6	(Kuznetsov et al., 2007)
	Adición de un sitio de <i>splicing</i> G>A en el In5.	Letal embrionario.	C57BL/6	(Smeenk et al., 2010)
<i>Fancp</i>	Interrupción del In3 por <i>-geo</i> y escisión del Ex3 mediante loxP.	Proporción de nacimientos disminuida, crecimiento reducido, anomalías en el desarrollo de ojo y cerebro incluyendo microftalmia, recuentos leucocitarios y de plaquetas bajos.	C57BL/6N	(Crossan et al., 2011)

El gen **FANCA** está mutado en cerca del 80% de los pacientes de AF españoles (Casado et al., 2007) por lo que el modelo deficiente de este gen es una herramienta muy valiosa para entender

la enfermedad y sugerir tratamientos para estos pacientes. Además, estos modelos de ratón han servido de plataforma para la investigación básica y preclínica para la AF (Gush et al., 2000; Rio et al., 2002; Navarro et al., 2006).

El **modelo *Fancc*^{-/-}** presenta un fenotipo atenuado en comparación con el observado en los pacientes, si bien estos ratones presentan hipogonadismo en los machos y fertilidad reducida en las hembras. Los individuos jóvenes presentan unos recuentos hematológicos de plaquetas anómalos y volumen corpuscular alto en sus eritrocitos.

A diferencia de los pacientes, las alteraciones descritas no desembocan en una anemia aplásica y tampoco presentan alteraciones óseas al nacimiento. Centrándonos en el compartimento de CMH, el modelo es más robusto: estos ratones tienen menos progenitores (lin⁻ o CFCs) y además éstos son más sensibles al estrés producido por el cultivo *ex vivo* (Rio et al., 2002). Además, al igual que los pacientes, las células *Fancc*^{-/-} presentan una elevada sensibilidad a agentes entrecruzantes del ADN como DEB o MMC (Cheng et al., 2000; Rio et al., 2002). El fenotipo de estos ratones puede ser rescatado por la expresión del ADNc del gen humano *FANCA* por lo que este modelo de ratón supone una herramienta fundamental para ensayar posibles protocolos de terapia génica (Rio et al., 2002).

2.2.- LA INMUNODEFICIENCIA COMBINADA GRAVE

La inmunodeficiencia combinada grave o SCID es una enfermedad genética que genera una inmunodeficiencia primaria. Los pacientes con esta enfermedad también son conocidos como “niños burbuja” porque necesitan vivir en un entorno anormalmente estéril debido a que son incapaces de hacer frente a patógenos o incluso a las infecciones más inocuas. En los casos SCID radiosensibles, los genes mutados no sólo intervienen en la generación de la inmunidad celular sino también en los mecanismos de reparación del ADN, como son los genes que constituyen la ruta de reparación de ADN por unión de extremos no-homólogos (NHEJ): DNA-PK, Artemis, RAG-1, RAG-2 y Ligasa IV entre otras.

2.2.1.- Manifestación fenotípica de la deficiencia en DNA-PKcs

Aunque en 1983 se describió un modelo de ratón T^B Scid radiosensible surgido a raíz de una mutación espontánea en el gen *Prkdc*, que codifica para la subunidad catalítica de la DNA-PK (DNA-PKcs) (Bosma et al., 1983; Araki et al., 1997), no fue hasta el año 2009 cuando se describió por primera vez una mutación en este gen en pacientes SCID humanos (van der Burg et al., 2009; Woodbine et al., 2013).

La primera paciente diagnosticada, una niña de 5 años aquejada de una inmunodeficiencia combinada grave, presentaba una carencia casi total de linfocitos T y B en sangre, con unos valores de NK normales. Un aspirado de MO permitió estudiar la población de precursores linfoides con un bloqueo total de la diferenciación, anterior al estadio pre-B-II, comparable al fenotipo que presentan los pacientes SCID con deficiencias en Artemis o RAG, donde se ve impedida la recombinación V (D)J. Además, ensayos clonogénicos con fibroblastos de la paciente demostraron una mayor sensibilidad frente a la exposición de radiaciones ionizantes (IR), con una presencia de marcadores de daño en el ADN (fosforilación de la histona H2AX) que se extendía en el tiempo, demostrando una reparación incompleta del daño generado. Por último, se pudo secuenciar parte del **gen *PRKDC*** donde se encontraron mutaciones en homocigosis. Estas mutaciones fueron rastreadas y así demostraron la existencia de portadores sanos a lo largo de su árbol genealógico, aunque siempre en heterocigosis, indicando que estas mutaciones tienen una

herencia autosómica recesiva. El segundo paciente, presentaba un fenotipo similar con ausencia de células T y B, agravado por presentar además serias anomalías neurológicas que resultaron fatales durante sus primeros años de vida, **tabla 3**. En este caso, la mutación también fue identificada de manera heterocigota en sus progenitores (Woodbine et al., 2013).

La DNA-PKcs es necesaria para la reparación de DSB en todos los tejidos, por lo que estos individuos son notablemente más sensibles al acondicionamiento por IR. Incluso se ven afectadas las CMHs. Éstas presentan defectos en el automantenimiento y ocupación del nicho, lo cual se ha demostrado en experimentos de repoblación competitiva (Qing et al., 2012).

2.2.2.- Proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs)

La subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (**DNA-PKcs**, del inglés *DNA Dependent Protein Kinase catalytic subunit*) está íntimamente ligada a uno de los principales mecanismos de reparación de roturas de ADN de doble hebra (**DSB**, del inglés *Double Strand Breaks*): la ruta conocida como **NHEJ**, así como a la prevención de la expresión aberrante de los genes afectados por estas lesiones en el ADN (Kuhn et al., 1995; Pankotai et al., 2012), ver **tabla 3**.

Tabla 3. Funciones asignadas a la DNA-PKcs.

Entorno	Función	Descripción	Referencias
Daño en el ADN	Vigilancia.	Une los extremos libres de ADN que aparecen en las roturas de doble hebra causadas por irradiación o nucleasas y se activa por autofosforilación.	(Jovanovic and Dynan, 2006; Uematsu et al., 2007)
	Señalización.	Señaliza la presencia del daño modificando otros factores de transcripción como p53 que tiene la capacidad de suspender la progresión celular para permitir su reparación.	(Araki et al., 1997; Allen et al., 2002)
	Activación de la ruta de NHEJ.	Activa mediante fosforilación otros componentes de la vía de reparación por NHEJ.	(Fulop and Phillips, 1990; Biedermann et al., 1991; Kurimasa et al., 1999)
	Inhibición de la transcripción.	Inhibe la transcripción de genes (RNA POL II) y ARNs ribosómicos (RNA POL I) a través de la lesión de ADN sin reparar.	(Kuhn et al., 1995; Pankotai et al., 2012)
Homeostasis	Mantenimiento telomérico.	Es necesaria para el correcto mantenimiento de los telómeros. En su ausencia, estos se erosionan pudiendo darse fusiones anómalas entre cromosomas.	(Samper et al., 2000; Gilley et al., 2001; Goytisolo et al., 2001)
Respuesta inmune	Maduración linfóide.	Participa en la generación del repertorio inmune, recombinación V (D)J del TCR y BCR, que es crítico para la maduración de linfocitos T y B.	(Bosma et al., 1983; Blunt et al., 1995; Franco et al., 2008; van der Burg et al., 2009; Woodbine et al., 2013)
Hematopoyesis	Nicho de las CMHs.	Afecta a la capacidad de injerto de las CMHs.	(Qing et al., 2012)
Neurogénesis	Embriogénesis y maduración neural.	Un paciente descrito presentaba microcefalia y defectos en la generación de surcos neurales.	(Woodbine et al., 2013)

La **DNA-PKcs** se asocia con **Ku70** y **Ku80** para formar la holoproteína **DNA-PK**, **figura 4**. Esta proteína reconoce y se une con una elevada afinidad a extremos libres de ADN (West et al., 1998), **figura 4**. La DNA-PKcs puede encontrarse formando un complejo con ARTEMIS (proteína con actividad nucleasa) y unirse a Ku acoplado a un extremo seccionado de ADN (Ma et al., 2002). Tras el ensamblaje, un desplazamiento interno de Ku pone en contacto la DNA-PKcs con el extremo de ADN, en este entorno se activa la capacidad serina/treonina quinasa de la DNA-PK (Yoo and Dynan, 1999; Hammarsten et al., 2000), esquematizado en la **figura 4**.

La activación de la actividad catalítica del dominio quinasa es un mecanismo directo para la transducción de señales y en este caso permite a la DNA-PK fosforilarse rápidamente a sí misma y también a ARTEMIS (Yoo and Dynan, 1999; Hammarsten et al., 2000; Ma et al., 2002). La

autofosforilación de la DNA-PK fuerza cambios estructurales que regulan su interacción con otras proteínas de la vía NHEJ (Goodarzi et al., 2006; Jovanovic and Dynan, 2006; Uematsu et al., 2007).

Estos cambios conformacionales despiertan la actividad endonucleasa 5' y 3' de ARTEMIS que actúa sobre los extremos protuberantes, lo que permite digerir un amplio abanico de sustratos ya sean de una sola cadena, de cadena doble u horquillas (Ma et al., 2005; Niewolik et al., 2006). Además de participar en la respuesta a ADN dañado (**DDR**, del inglés *DNA Damage Response*), la DNA-PK participa en los procesos de reordenamiento V (D)J y cambio de isotipo. Sin estos dos procesos no se puede generar una inmunidad completa en vertebrados superiores, por lo que se produce una inmunodeficiencia combinada grave. No acaba aquí el trabajo de la DNA-PK, ya que también previene la mutagénesis transcripcional de ARN ribosómicos y ARN mensajeros, al inhibir la ARN polimerasa I y III cuando estas se encuentran transcribiendo genes afectados por DSB (Kuhn et al., 1995; Pankotai et al., 2012), ver **tabla 3**.

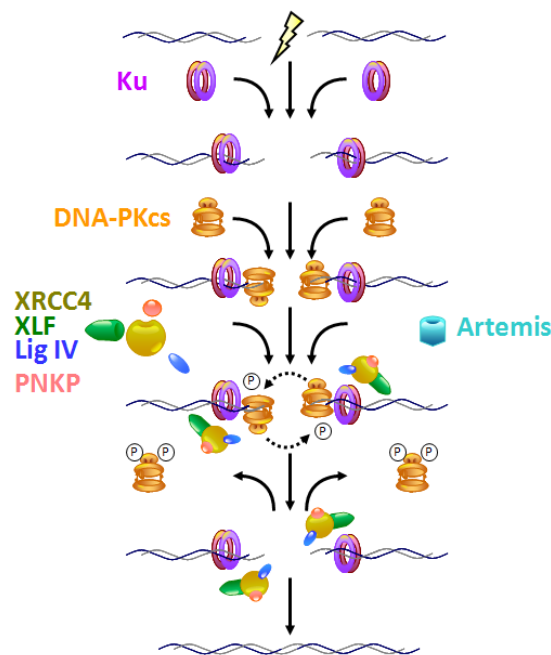


Figura 4. Participación de la DNA-PKcs en la ruta de NHEJ. El dímero Ku70/Ku80 (Ku) reconoce con alta afinidad los extremos libres de las lesiones de ADN de doble hebra y recluta a la subunidad catalítica (DNA-PKcs) con la que ensambla el complejo DNA-PK. Éste, unido a un extremo de ADN, es capaz de autofosforilarse y a su vez recluta y modifica otros componentes necesarios para el funcionamiento de la ruta de NHEJ. Entre estos se encuentran XRCC4, Cernunos (XLF), ligasa IV (Lig IV), PNKP o la nucleasa Artemis. Éstos se encargarán de recuperar la integridad de la hebra de ADN en un proceso que puede llevar asociado tanto la pérdida de los nucleótidos adyacentes al extremo de la lesión como la inclusión aleatoria de nuevas bases en el punto de unión.

En el caso de los ARN ribosómicos, la DNA-PKcs trabaja conjuntamente con Ku y en el caso de los ARN mensajeros, la subunidad catalítica tiene mayor peso en la inhibición de la RNA POL I.

Finalmente, cabe destacar que el producto de la *PRKDC* juega un papel importante en el mecanismo que media la muerte de los leucocitos infectados por VIH, posiblemente mediante su capacidad de señalar la presencia de DSBs generadas por actividad de integración de las réplicas víricas y puede ser por tanto una importante diana terapéutica para prevenir la fase aguda de individuos infectados (Cooper et al., 2013).

2.2.3.- Modelo de ratón Scid

Como se ha mencionado, los ratones Scid presentan un fenotipo inmunodeficiente

caracterizado por la ausencia de células B y T, aunque la penetrancia no es completa en individuos envejecidos. Se publicó en 1983 como modelo de ratón inmunodeficiente generado por mutación espontánea, sin células T ni B (T^BSCID) pero con células NK (Bosma et al., 1983). En publicaciones posteriores se observó que poseía una **elevada radiosensibilidad** (Biedermann et al., 1991) y presentaba **problemas de recombinación V (D)J** que justificaban su falta de linfocitos adultos funcionales (Blunt et al., 1995).

Se localizó la mutación en el antepenúltimo exón del gen *Prkdc*: una transversión A→T que genera un codón de parada truncando la síntesis de la proteína (Fulop and Phillips, 1990). Esta alteración genera una nueva diana para la enzima de restricción Alu I: 5'-taTGCTaa-3' (wt)→ 5'-taAGCTaa-3' (*Scid*). Esta digestión se puede emplear para diferenciar el genotipo de ratones *Scid* respecto a controles. Más tarde el gen se mapeó en humanos (Sipley et al., 1995) donde también juega un papel fundamental en la maduración de los linfocitos al estar involucrado en la generación del repertorio del sistema inmune y en el cambio de isotipo (Kurimasa et al., 1999; Allen et al., 2002; Uematsu et al., 2007; van der Burg et al., 2009).

Debido a la ineficacia para resolver DSB en el ADN, estos ratones son especialmente sensibles a IR así como a agentes radiomiméticos (Biedermann et al., 1991). Además, las líneas celulares establecidas a partir de células de ratones *Scid* presentan unos **telómeros anormalmente largos** en cultivo (Goytisolo et al., 2001).

Cabe destacar que el grado de inmunosupresión natural de este modelo de ratón ha propiciado que haya sido ampliamente empleado para estudios que nada tienen que ver con su mutación en sí. Su incapacidad para rechazar células ajenas tanto en alotrasplante como en xenotrasplante lo ha convertido en un receptor ideal donde estudiar el comportamiento de células humanas procedentes de donantes sanos o pacientes de distintas enfermedades (Mosier et al., 1988; Phillips et al., 1989). De hecho, supuso una herramienta fundamental para definir las **SRC**: la población de CMH humanas, presente en los inóculos hematopoyéticos, capaces de reconstituir los ratones *Scid* y generar hematopoyesis humana (Kamel-Reid and Dick, 1988; McCune et al., 1988).

3.- TERAPIA GÉNICA

La genética es una de las ramas de la biología que ha sufrido más avances gracias a los nuevos desarrollos tecnológicos del siglo XX. A nivel molecular se ha pasado de identificar en el ADN el código genético a desentrañar la secuencia completa del genoma humano en el lapso de 60 años (Avery et al., 1944; IHGSC, 2004), explicando la existencia de las enfermedades hereditarias y encontrando en el ADN el origen pormenorizado de numerosas enfermedades adquiridas tan difíciles de explicar como es el cáncer. Es precisamente en estos dos escenarios donde hoy parece que la genética puede, además de dar una respuesta a los interrogantes científicos, ofrecer una solución terapéutica a enfermedades genéticas a través de la terapia génica.

La terapia génica consiste en el “uso de genes como medicamentos”. Esto conlleva la incorporación de una secuencia funcional o terapéutica de ácidos nucleicos en determinadas células de un paciente para corregir o paliar un defecto genético. Puede emplearse para sustituir un gen defectuoso o para introducir un nuevo gen cuya expresión cure a un paciente o mejore su condición o evolución clínica. El rango de afecciones que se podrían beneficiar de estas nuevas técnicas es extenso, incluyéndose el tratamiento de numerosas enfermedades hereditarias, algunos tipos de cáncer e incluso ciertas infecciones víricas como el VIH.

3.1.- TRANSFERENCIA DE GENES TERAPÉUTICOS

El primer ensayo clínico de transferencia génica tuvo lugar en 1989 para tratar pacientes con melanoma mediante la infusión de linfocitos obtenidos de infiltrados del tumor marcados genéticamente (Kasid et al., 1990; Rosenberg et al., 1990). En algo más de dos décadas, más de 1.800 ensayos repartidos en 31 países han consolidado esta práctica, **figura 5** derecha. Destaca el gran número de ensayos dedicados a combatir el cáncer y en segundo lugar el tratamiento de enfermedades monogénicas (Edelstein et al., 2007; Ginn et al., 2013), **figura 5** izquierda. El desarrollo de la terapia génica y su aplicación en la clínica ha sido lento y con momentos difíciles. En los años 90, los primeros estudios clínicos tuvieron resultados discretos o insuficientes (Blaese et al., 1995; Dunbar et al., 1995; Kohn et al., 1995; Bonini et al., 1997). Se buscó entonces mejorar la eficacia y potencia de los vectores.

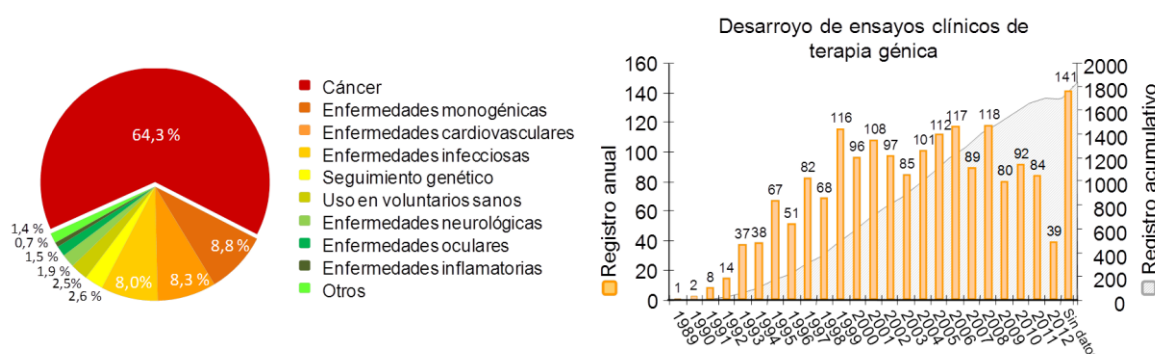


Figura 5.- Ensayos clínicos de terapia génica aprobados en el mundo. **Izquierda:** Distribución de los ensayos de terapia génica aprobados en fases clínicas en función de su diana terapéutica. **Derecha:** Evolución anual del registro de ensayos clínicos según su año de aprobación (barras) junto con la curva de crecimiento del registro (área gris), adaptado de Ginn 2013 (Ginn et al., 2013).

En 1999 falleció en Estados Unidos un paciente de 18 años, con **deficiencia en ornitina transcarbamilasa (OTC)**, sometido a un tratamiento experimental de terapia génica con vectores adenovirales. Se comprobó que la causa fue una reacción inflamatoria desproporcionada contra el vector, un adenovirus (Marshall, 1999), lo cual sentó precedente tanto jurídico como en la opinión pública de Estados Unidos, cercando la investigación en este campo (Couzin and Kaiser, 2005).

Casi en las mismas fechas, en Francia se anunciaba cómo la terapia génica curaba una grave enfermedad monogénica en un ensayo llevado a cabo en pacientes con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (**SCID-X1**) (Cavazzana-Calvo et al., 1999).

La mejoría clínica y estabilidad de las células modificadas ha sido constatada en este y otros ensayos clínicos con **vectores y-retrovirales (RV)**: SCID-X1 en Reino Unido (Gaspar et al., 2004) y Australia (Ginn et al., 2005); granulomatosis crónica hereditaria en Suiza-Alemania (Ott et al., 2006) y la deficiencia en adenosina deaminasa en Reino Unido (Gaspar et al., 2006) e Italia (Muul et al., 2003). A pesar de esto, la aparición de **efectos adversos** en algunos pacientes sometidos a estos ensayos levantó una gran polémica (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; ESGCT, 2006; Howe et al., 2008). En casi todos los casos el origen del problema se hallaba en la **mutagénesis insercional** producida por los RVs. A raíz de lo cual, los expertos en el campo se han volcado en buscar métodos para aumentar la seguridad de estos protocolos de transferencia génica, impulsando una revisión de secuencias accesorias en los vectores (wPRE, HS1,...), migrando hacia el uso de nuevos vectores auto-inactivantes y recurriendo a promotores que dirijan una expresión moderada y específica de tipo celular.

Además, desde la investigación básica se han asentado las bases para la evolución hacia

plataformas más seguras, por lo que las preferencias actuales en cuanto a vectores, **figura 6**, podrían cambiar en los próximos años. Empleando el esqueleto del lentivirus VIH tipo 1, se han diseñado vectores lentivirales autoinactivantes (SIN-LV) (Akkina et al., 1996; Naldini et al., 1996; Reiser et al., 1996), que tras más de una década de investigación están siendo empleados con éxito en protocolos clínicos de terapia génica (Cartier et al., 2009; Cavazzana-Calvo et al., 2010; Biffi et al., 2011; Cartier et al., 2012; Scaramuzza et al., 2012). Otros sistemas no-virales más seguros y que se encuentran a punto de incorporarse en ensayos clínicos son los transposones (Williams, 2008; Hackett et al., 2010; Ivics and Izsvak, 2011).

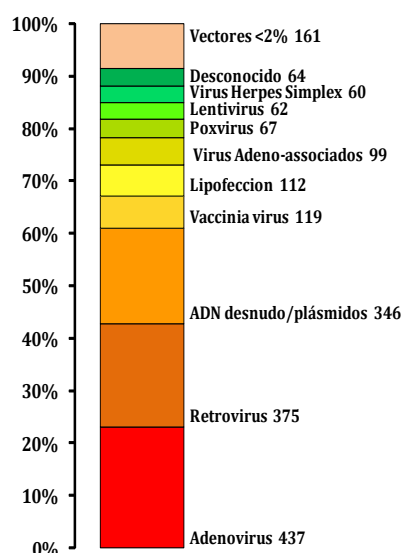


Figura 6. Distribución de los ensayos de terapia génica aprobados en función del vector de transferencia génica empleado. Junto a cada grupo se recoge el número de ensayos recogidos en todo el mundo en 2013 (Ginn et al., 2013). <2% agrupa a todos los vectores con una representación inferior a dicho corte.

Por último cabe destacar cómo la modificación genética dirigida, con una eficacia aún modesta en la actualidad, podría ser empleada en ensayos clínicos de manera inminente tras demostrar su eficacia en el control de las infecciones de VIH mediante la modificación dirigida del receptor CXCR5 (Perez et al., 2008; Yuan et al., 2012).

3.2.- VECTORES LENTIVIRALES

Los virus, al ser microorganismos muy sencillos, fueron los primeros organismos en ser secuenciados en su totalidad (Sanger et al., 1977). La disección de sus distintos módulos ha permitido la generación de vectores recombinantes mediante el ensamblaje selectivo de determinadas funciones. En los vectores virales, como esquema general, se respetan las secuencias necesarias para la encapsidación y la transducción, mientras que la carga genética que determina la virulencia se sustituye por las secuencias de interés.

El ciclo genérico de los retrovirus comprende las fases de adsorción, internalización, retro-transcripción, integración, replicación y encapsidación, **figura 7**. Antes de la integración se debe dar la retro-transcripción del genoma (**ARN⁺**) por una enzima, transcriptasa inversa, capaz de generar un **ADN circular de doble hebra** que será sustrato de la integrasa. Los lentivirus poseen una **fase de lítica** prolongada en la que permanecen latentes, integrados en el genoma huésped hasta su reactivación. En este punto pasan a ser **lisogénicos**.

La familia **Retroviridae** comprende varios géneros que han sido empleados como molde para

el diseño de vectores de transferencia génica: **Alfaretrovirus** (Suerth et al., 2010; Suerth et al., 2012), **Gammaretrovirus** (Mann et al., 1983; Rosenberg et al., 1990), **Lentivirus** (Akina et al., 1996; Naldini et al., 1996; Reiser et al., 1996) y **Espumavirus** (Hirata et al., 1996; Russell and Miller, 1996).

Lentivirus y *Gammaretrovirus* son patógenos celulares que a lo largo de la evolución se han especializado en infectar cierto tipo de células, aunque su tropismo puede ser redirigido gracias al pseudotipado que consiste en la sustitución de la envuelta natural por otra de diferente origen. Los lentivirus son un vehículo excepcional para introducir genes de interés dentro de las células diana (von Schwedler et al., 1994; Gallay et al., 1995, Akina, 1996 #24; Naldini et al., 1996; Reiser et al., 1996). Son virus pequeños con envuelta lipídica que poseen un genoma compuesto por dos copias ARN de cadena positiva, con ~10 kb, que se encapsidan con proteínas capaces de “retrotranscribir” e integrar dicho genoma en la célula infectada (Coffin et al., 1997). Presentan ciertas ventajas con respecto a los retrovirus de clase C, **tabla 4**. Sin embargo, los *Gammaretrovirus* fueron los elegidos para construir los vectores gamaretrovirales (γ -RV) de los primeros protocolos exitosos de terapia génica (Cavazzana-Calvo et al., 1999) y que aún se utilizan en algunos ensayos clínicos (Edelstein et al., 2007).

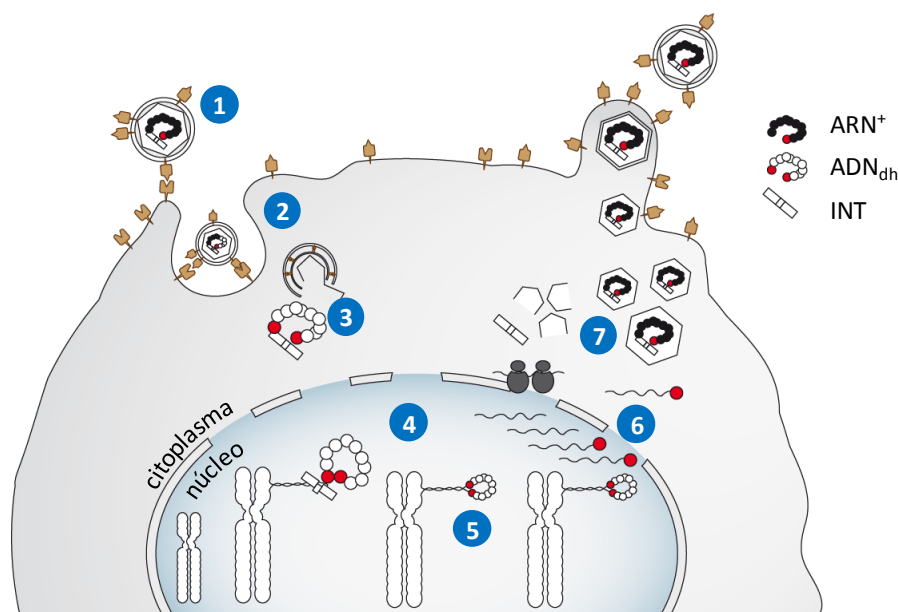


Figura 7. Ciclo genérico de un retrovirus. Comprende las fases de 1) **adsorción**, que es la interacción específica entre componentes expuestos del virus y proteínas de superficie de la célula diana; 2) **internalización**, proceso por el cual el virus se introduce dentro de la célula por endocitosis activa y es liberado desde las vesículas; 3) **retrotranscripción** del genoma (ARN^+) por una enzima transcriptasa inversa capaz de generar un **ADN** circular de doble hebra; 4) **integración** mediada por la maquinaria del virus; 5) los lentivirus poseen una **fase de lítica** prolongada en la que permanecen latentes, integrados en el genoma huésped pero sin actividad; 6) la expresión durante la fase lisogénica sirve para la **replicación** y 7) **encapsidación**: el **ARNm** sirve a la vez de molde para las proteínas víricas y como genoma a encapsidar. ARN^+ , genoma vírico ARN, ADN_{dh} , genoma vírico retrotranscrito a ADN de doble hebra; INT, proteína retrotranscriptasa e integrasa.

3.3.- INTEGRACIÓN RETROVIRAL

Cuando un LV se produce en combinación con mutantes de la proteína INT, por ejemplo el mutante D64V, se generan vectores que carecen de la actividad integrasa (Leavitt et al., 1996). Estos vectores no-integrativos acompañan y facilitan la entrada del ADN retrotranscrito hasta el núcleo, donde el episoma permanece independiente (Yanez-Munoz et al., 2006). En cambio, los vectores producidos con la INT natural no sólo facilitan y acompañan la entrada del vector al

núcleo, sino que también lo insertan de manera estable en el genoma de la célula tratada (von Schwedler et al., 1994; Gallay et al., 1995; Akkina, 1996 #24; Naldini et al., 1996; Reiser et al., 1996).

La propiedad de los γ -RVs para utilizar promotores potentes e inespecíficos, unido a su capacidad para integrarse de manera estable, ha hecho de estos vectores una herramienta para buscar oncogenes gracias a su potencial para transactivar genes anexos a su integración (Akagi et al., 2004).

Tabla 4. Diferencias entre vectores γ -retrovirales y lentivirales.

Comparación	Vectores γ -retrovirales (RV)	Vectores lentivirales (LV)
Origen	Varios: género <i>gammaretroviridae</i> , clase "C". Destaca el virus de leucemia Moloney de ratón (MMLV).	VIH clase 1
Tropismo original	Según cepa, siempre células en división.	Leucocitos T4 humanos.
Pre-integración	La retro-transcripción forma círculos episomales ADN _{dh} en el citoplasma.	La retro transcripción forma círculos ADN _{dh} de 1 o 2 LTRs unidos a INT.
Acceso al genoma	Confinado en el citoplasma. Se integra durante la mitosis.	La integrasa (INT) transporta el ADN activamente al núcleo y lo integra.
Perfil de integración	Preferencia por las proximidades de los TSS y regiones CpG.	Preferencia por regiones RefSeq activas.
Riesgos insercionales	Las LTRs pueden actuar como promotor o <i>enhancer</i> de genes aledaños, transactivando proto-oncogenes.	Puede interrumpir secuencias codificantes y/o de regulación post-transcripcional de genes supresores de tumores.
Estabilidad	Sufre fenómenos de silenciamiento, variegación y extinción.	Sufre silenciamiento y variegación. Aún no se ha podido caracterizar la extinción.
Mejoras en desarrollo	Migración a diseños SIN. Secuencias de aislamiento. Secuencias UCOE anti-silenciamiento.	Mejora de la estabilidad de los lentisomas no integrativos. Secuencias de aislamiento. Secuencias UCOE anti-silenciamiento.

Los mecanismos que se postulan para explicar la mutagénesis insercional de estos vectores son mayoritariamente dos: en el caso de los RVs se debe fundamentalmente a la **transactivación de proto-oncogenes** cercanos a la integración (Li et al., 2002; Modlich et al., 2005; Modlich et al., 2008) y en el caso de los LV adquiere una mayor relevancia la **disrupción de genes supresores de tumores** (Heckl et al., 2012).

Gracias a los avances de la genética y la genómica disponemos de herramientas, como la LAM-PCR (*Linear Amplification-Mediated PCR*) o la nrLM-PCR (*non restrictive Ligation Mediated PCR*), para el estudio de los patrones de integración de RVs y LVs (Mueller and Wold, 1989; Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2007; Gabriel et al., 2009; Paruzynski et al., 2010). Estas técnicas han permitido conocer que el estado de la célula afecta a este perfil de integración, ya que las integraciones tienden a acumularse en regiones activamente transcritas (Cattoglio et al., 2010a). Aunque los RV tienen una alta preferencia por integrarse en regiones promotoras y reguladoras en torno al inicio de transcripción (TSS) de los genes (Cattoglio et al., 2007; Deichmann et al., 2011), los LVs se integran a lo largo de las unidades transcripcionales accesibles pero sin verse especialmente atraídos por regiones promotoras (Cattoglio et al., 2010a; Cattoglio et al., 2010b), **tabla 4**.

3.4.- SEGURIDAD DE LOS VECTORES INTEGRATIVOS

A pesar de que algunos γ -retrovirus salvajes se habían empleado para describir proto-oncogenes, la primera evidencia experimental de **mutagénesis insercional** de RVs diseñados para

terapia génica, basados en el γ -retrovirus MMLV, tardó en llegar. De hecho, la primera publicación sobre la transformación en ratones de un clon leucémico por una integración cerca de **Evi1** (Li et al., 2002) se realizó tan sólo un día después de que se publicara el primer informe de seguimiento, de más de 2 años, del ensayo clínico SCID-X1 en Francia (Hacein-Bey-Abina et al., 2002). Un año más tarde se detectó el primer clon leucémico en los pacientes, por **transactivación del proto-oncogén LMO2** (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Estos acontecimientos (ESGCT, 2006; Howe et al., 2008) forzaron a los investigadores en el campo de la terapia génica a buscar modelos más sensibles para mejorar la predicción de riesgos genotóxicos que permitieran diseñar terapias más seguras (Baum et al., 2003). Esto supone un desafío porque las leucemias inducidas por mutagénesis insercional que surgen en modelos de terapia génica en ratón son muy poco frecuentes.

3.4.1.- Modelos predictivos de genotoxicidad *in vitro*

Basándose en las premisas de que un fenotipo tumoral es resultado de un proceso progresivo que requiere la cooperación de varios factores (Hahn and Weinberg, 2002) y que presenta cierta latencia (Modlich et al., 2008), se han desarrollado ensayos *in vitro* que aumentan la sensibilidad de detección de alteraciones malignas a costa de distanciarse de las condiciones y tipos celulares empleados en la terapia génica. Así, el ensayo de transformación de CMH desarrollado en el laboratorio del Dr. C. Baum se ha utilizado para evaluar la seguridad de numerosos vectores (Modlich et al., 2006; Modlich et al., 2009). Gracias a estos ensayos se ha establecido la conveniencia de usar construcciones SIN-LV con promotores internos moderados, como el SIN-LV PGK *FANCA wPRE^{mut}*, por inducir una menor tasa de transformación celular (Modlich et al., 2009). Este ensayo recuerda a los experimentos clásicos de búsqueda de oncogenes a través de la transformación de líneas dependientes de citoquinas (Stocking et al., 1988), pero se actualiza empleando progenitores de ratón (lin⁻) y variando los medios y diluciones para asignar una **frecuencia de transformación** a cada vector. Paralelamente también se pueden realizar estudios en líneas celulares no-transformadas, para asociar un riesgo de transformación a distintos vectores (Bokhoven et al., 2009). Estos estudios *in vitro* pueden aportar una medida de la capacidad de transformación de un vector, pero no son siempre concluyentes o extrapolables al entorno clínico (Bokhoven et al., 2009).

3.4.2.- Modelos predictivos de genotoxicidad *in vivo*

El estudio de la capacidad de transformar **progenitores hematopoyéticos humanos** *in vivo* empleando modelos de xenotrasplante en ratones inmunodeficientes requiere un seguimiento durante periodos prolongados. A pesar de ello, presenta cierta **heterogeneidad** entre individuos y, si no se combina con la detección de clones individuales, este método presenta una **sensibilidad insuficiente**: no consiguiendo distinguir el riesgo de células tratadas con γ -retrovirus frente a células sin tratar (Bauer et al., 2008).

En un intento por aumentar la sensibilidad, otros grupos han decidido recurrir a modelos con predisposición al desarrollo de tumores para facilitar la transformación. El modelo de ratón ***Cdkn2^{null}*** es un modelo propenso a la aparición de tumores (Serrano et al., 1996). Se pueden comparar distintos vectores transduciendo células lin⁻ de ratones *Cdkn2^{null}* y a continuación inoculándolas en receptores neonatos sanos (Montini et al., 2006; Montini et al., 2009). En este modelo, todos los ratones desarrollan displasias, pero cuando las células se tratan con un vector con mayor riesgo genotóxico esto se refleja en una aceleración en los tiempos de aparición y

severidad de las mismas, que pueden ser trasplantadas, amplificadas y secuenciadas para conocer la naturaleza de las integraciones que contribuyen a la transformación. Los resultados apoyan claramente el empleo de vectores SIN-LV y también el uso de promotores débiles, pero sobre todo señalan el uso de esqueletos γ -RV como mayor factor de riesgo (Montini et al., 2006; Montini et al., 2009).

3.4.3.- Recambio clonal y genotoxicidad *in vivo*

En los modelos anteriores siempre se detectan clones ya transformados. Sin embargo, en los casos de mutagénesis insercional registrados en humanos, la progresión hacia la leucemia es un proceso gradual (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; ESGCT, 2006; Howe et al., 2008) y es precedido por alteraciones en el recambio clonal de las células maduras detectadas en sangre periférica: se observa una dominancia clonal por parte de ciertos clones y, aunque una oligoclonalidad mantenida ha resultado terapéutica, la reducción de la policlonalidad se relaciona con el desarrollo de displasias (Ott et al., 2006; Fehse and Roeder, 2008; Modlich et al., 2008; Cavazzana-Calvo et al., 2010). Esto hace que el análisis de integraciones y su contribución clonal sean de vital importancia en la monitorización de los pacientes tras el tratamiento.

Mediante protocolos de terapia génica en modelos animales, y ayudados de estas mismas herramientas, podemos definir la cinética clonal de las células transducidas y conocer de antemano el riesgo de que determinadas integraciones de un vector colaboren con estos procesos pre-tumorales (Schmidt et al., 2003; Woods et al., 2003; Schmidt et al., 2007). Además, contamos con potentes herramientas moleculares basadas en la amplificación de integraciones discretas (Mueller and Wold, 1989; Silver and Keerikatte, 1989; Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2002) que, apoyadas por las técnicas de secuenciación masiva, nos permiten resolver la aportación de clones individuales en los animales receptores que hayan sido trasplantados con estas células (Schmidt et al., 2007; Gabriel et al., 2009). Este enfoque aumenta notablemente la sensibilidad y capacidad de predicción de riesgos asociados a la modificación genética y trasplante de células hematopoyéticas y ha sido empleado en estudios clínicos y preclínicos con células de pacientes (Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Schmidt et al., 2003; Ott et al., 2006; Schwarzwaelder et al., 2007; Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008; Biffi et al., 2011; Cartier et al., 2012) y también en modelos de enfermedades humanas en ratón (Mantovani et al., 2009; Ronen et al., 2011). Esta aproximación es precisamente el tipo de experimentación preclínica que hemos desarrollado en esta memoria para evaluar *in vivo* la seguridad del vector SIN-LV PGK FANCA $wPRE^{MUT}$.

3.4.4.- Principales factores de riesgo

Uno de los elementos en que se hace mayor hincapié es el **diseño del vector**. La elección de vectores SIN frente al uso de vectores con las LTR intactas reduce notablemente la capacidad transformante de los vectores (Modlich et al., 2006; Montini et al., 2006; Modlich et al., 2009; Montini et al., 2009). Debido a su diferente patrón de integración, **tabla 4**, se considera que es más seguro la elección de **LVs** frente a los **RVs** (Montini et al., 2006; Nienhuis et al., 2006; Bokhoven et al., 2009; Modlich et al., 2009; Montini et al., 2009). En el caso de los vectores SIN, es importante prestar atención a la **potencia del promotor interno**. En estudios comparativos de transformación, los promotores fisiológicos se proponen como la opción más segura (Modlich et al., 2009). No hay que descuidar tampoco las **secuencias accesorias** (Schambach et al., 2006) así como la existencia de sitios crípticos de **splicing** que pueden generar transcritos de fusión

aberrantes (Almarza et al., 2011; Cesana et al., 2012; Moiani et al., 2012).

Los **tiempos prolongados de manipulación *ex vivo*** merman la capacidad de injerto a largo plazo de las células modificadas genéticamente y pueden contribuir a expandir clones con alguna ventaja proliferativa (Maetzig et al., 2011). También la **formulación de los medios** para la propagación de progenitores *ex vivo* pueden afectar en gran medida a la selección y amplificación de clones malignos (Maetzig et al., 2011).

4.- TERAPIA GÉNICA DE LA ANEMIA DE FANCONI “A”

4.1.- ENSAYOS PREVIOS

El primer ensayo clínico de terapia génica en pacientes de AF, se llevó a cabo en la década de los 90 en Estados Unidos, para corregir pacientes con mutaciones en *FANCC* (Liu et al., 1997; Liu et al., 1999). En un ensayo piloto de terapia génica para *FANCC*, partieron de células de MO y de progenitores movilizados con G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*). Los cultivos enriquecidos en progenitores CD34⁺ fueron preestimulados y transducidos con RVs durante 3 días. Tras este periodo, las células CD34⁺ fueron lavadas e infundidas en los pacientes. A pesar de que la transducción fue eficiente y que consiguieron detectar con éxito células corregidas en la sangre periférica de los pacientes, el inóculo no injertó de manera estable (Liu et al., 1997; Liu et al., 1999; Kelly et al., 2007), por lo que no se detectó un efecto terapéutico como consecuencia de la terapia génica.

Actualmente, según el portal www.clinicaltrials.gov, en Estados Unidos existen varios ensayos clínicos cerrados, o en estado desconocido, en los que se pretendía emplear la transferencia génica con RVs y auto-trasplante de las células corregidas en pacientes con mutaciones en *FANCC* (NCT00005896; NCT00001399) y *FANCA* (NCT00272857).

Numerosos investigadores proponen que se pueden mejorar los protocolos de terapia génica de AF empleando LVs y minimizando el tiempo de cultivo *ex vivo* para potenciar al máximo el injerto (Tolar et al., 2011; Tolar et al., 2012). Por ello se han abierto ensayos clínicos para la corrección de pacientes AF empleando LVs optimizados tanto en Estados Unidos (NCT01331018) como en Europa (EudraCT: 2011-006100-12).

4.2.- EL VECTOR LENTIVIRAL PROPUESTO PARA EL ENSAYO CLÍNICO FANCOLEN-1

Nuestro grupo presentó en 2010 a la Agencia Europea del Medicamento un vector SIN-LV PGK *FANCA wPRE^{MUT}* (*FANCA*-LV) diseñado para la corrección genética de células de pacientes AF del grupo de complementación “A” (Gonzalez-Murillo et al., 2010). Tras haber sido reconocido bajo la designación de medicamento huérfano por la Comisión Europea (EU/3/10/822 et al., 2010), este vector ha sido propuesto en un foro internacional de expertos en AF como herramienta para la terapia génica en pacientes *FANCA* (Tolar et al., 2011).

Para la producción del vector se empleó la construcción PGK *FANCA wPRE^{MUT}* clonada sobre un plásmido pUC19 con resistencia a ampicilina. El plásmido tiene un tamaño de 11,6 kb, de los cuales aproximadamente 8 kb son transcritas en el ARN mensajero. Dos moléculas de ARN van a coordinarse con las proteínas suministradas por los plásmidos empaquetadores y a encapsidarse en cada partícula viral. La LTR original del virus VIH-1 fue mutada eliminando nucleótidos clave de la región U3, por lo que la LTR resultante no es capaz de dirigir la expresión de genes ni en el plásmido ni en la forma integrada tras la retro-transcripción.

Por tanto, para poder sintetizar los vectores se incorporó, en el extremo 5' de la secuencia R-

U5, la secuencia promotora **CMV-IE prom** (*Citomegalovirus Immediate Early Enhancer/Promoter*) de unos 673 pb, que dirige la expresión del ARNm que se empaqueta en las cápsidas infectivas. Esta secuencia en 5' no forma parte del vector ensamblado.

Además, las LTRs no son funcionales tras la integración, siendo por tanto un vector auto-inactivante o SIN (*self-inactivating vector*). A su vez, los plásmidos empaquetadores no poseen la secuencia Psi y eso impide que se puedan empaquetar dentro de las partículas infectivas. Sólo se empaqueta la secuencia de interés: presente en el plásmido transferente que sí incluye una secuencia Psi.

Cada cadena de ARN una vez retrotranscrita, dentro de su célula diana, generará un ADN de doble hebra que contendrá las siguientes secuencias reflejadas también en la **figura 8**:



Figura 8.- Vista esquemática del vector FANCA-LV integrado en el genoma de la célula huésped. El diseño y los componentes se detallan en el texto.

LTR en 5' (Long Terminal Repeat) que consiste en la secuencia **Δ18U3-R-U5** que se compone por la secuencia terminal repetida (**R**) flanqueada por la secuencia terminal única en 3' (**U3**) que fue mutada (**Δ18U3**) y la secuencia terminal única en 5' (**U5**). La secuencia repetida "R" de la LTR en 3' reconoce a la secuencia R de la LTR en 5', cerrando un bucle de ARN en el vector y promoviendo la circularización del ADN retrotranscrito.

Ψ (Psi) o señal de empaquetamiento. Es una secuencia con una estructura secundaria característica que forma 4 bucles (**SL1, SL2, SL3, SL4**) necesarios para la interacción con las proteínas que median la correcta incorporación del ARN vírico a la cápsida. La señal **Ψ** en el HIV-1 se extiende abarcando varias secuencias:

* **SD (Splice Donor)** o donador de *splicing*. La presencia de señales de procesamiento post-transcripcional mejora los títulos al reducir la degradación del ARN.

* **PBS (Primer Binding Site)** que incluye secuencias donde se une el ARN transferente que sirve de cebador para la retrotranscripción del HIV-1. El vector conserva 151 nt del PBS porque incluyen parte de la secuencia **Ψ**: SL1, SL2 y SL3.

* **ga**: gen *Gag* deletado. Las secuencias que codifican para proteínas víricas han sido eliminadas deliberadamente y forman parte de los genes facilitados en *trans* durante la producción, esta secuencia residual no codificante responde a la necesidad de mantener el brazo SL4: una estructura secundaria necesaria para la encapsidación del vector.

RRE (Rev Response Element) o elemento de respuesta a la proteína Rev. También se conserva en el vector por ser necesaria para la producción del mismo.

SA (Splice Aceptor) o receptor de *splicing*. Hace pareja con el **SD** anterior que mejora los títulos al reducir la degradación del ARN.

CPPT (Central Polypurine Tract) o tracto central de polipurinas, que se incluye también atendiendo a cuestiones estructurales del vector.

hPGK, secuencia promotora del gen humano PGK (*Phosphoglycerate Kinase*). Es un promotor interno fisiológico que dirige la expresión ubicua y moderada de los genes de interés que se coloquen en 5'.

hFANCA, cDNA que codifica para la versión normal de la proteína humana de la anemia de Fanconi del grupo de complementación A expresada por el gen *FANCA* localizado en el

cromosoma 16 en el brazo largo 16q24.3. La secuencia del cDNA *FANCA* supone un total de 4.376 bp.

wPRE^{MUT} (*Woodchuck Hepatitis Virus [WHV] post-transcriptional regulatory element*) es una secuencia original del virus de la hepatitis de la marmota que tiene la capacidad de estabilizar los ARNm aumentando la cantidad de proteína generada por transcrito. La secuencia original codifica la proteína X, relacionada con hepatocarcinomas. Esta versión mutada ha eliminado 4 posibles sitios críticos de expresión de dicha proteína.

LTR en 3', igual que la LTR en 3' se forma cuando la retrotranscripción se extiende usando como cebador el extremo 3' libre de la secuencia repetida **R** y forma la secuencia **Δ18U3-R-U5** que va a ser sustrato de la integrasa (INT) que va a insertar el vector en el genoma de la célula diana.

5.- REPROGRAMACIÓN CELULAR

5.1.- CÉLULAS MADRE TOTI-, PLURI- Y MULTIPOTENTES

De manera análoga a la generación y maduración de las células sanguíneas, a lo largo de la ontogenia las células embrionarias van a ir multiplicándose y modulando su plasticidad. Todo comienza en el cigoto, esta célula es **totipotente**: posee la capacidad de generar no sólo todos los tejidos del individuo, sino también tejidos extra-embrionarios de soporte como el trofoectodermo (la placenta). Este estado es temporal y en las subsiguientes divisiones celulares encontramos células madre embrionarias **pluripotentes** o **ESCs** (*Embryonic Stem Cells*) que van a generar las tres láminas embrionarias que formarán la totalidad de tejidos en los animales celomados: **endodermo, mesodermo y ectodermo**, pero estas ESCs ya no pueden contribuir a formar la placenta. Las ESCs fueron aisladas por primera vez de la masa celular interna del blastocisto (ICM, *Inner Cell Mass*) de ratones (Evans and Kaufman, 1981) y de blastocistos humanos (Thomson et al., 1998). En los medios adecuados, las ESCs se pueden mantener en cultivo *ex vivo* durante tiempos prolongados sin perder sus características (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson et al., 1998). El siguiente estadio de diferenciación lo comprenden **las células madre multipotentes**, cuya descendencia está sometida a las restricciones de cada capa germinal. Estos progenitores no son exclusivos del periplo embrionario y algunos, como las CMHs, seguirán presentes a lo largo de toda la vida adulta del organismo para dar soporte a los tejidos a los que pertenecen.

5.1.1.- Quiescencia y senescencia celular

El ciclo celular normal se basa en una sucesión de etapas entre las que destacan una fase de síntesis de ADN (**fase S**, en la que la célula duplica su material genético) y el proceso de **mitosis** (en el que se reparte el material genético junto con el contenido citoplasmático entre dos células hijas). Entre ambos momentos, la célula produce las proteínas necesarias para su auto-mantenimiento, crecimiento y control del ciclo. Estos periodos comprenden: las fases **G₁** (antes de la fase S) y **G₂**, (separando la fase S y la mitosis) (**G₁** y **G₂**, del inglés *Gap*). El crecimiento y la replicación de las células en los organismos superiores están fuertemente contralados en función de las necesidades del organismo.

Determinadas células, por ejemplo las CMHs, se caracterizan por detener su progresión en el ciclo celular tras la mitosis, permaneciendo en **quiescencia** (Visser et al., 1984). Esto se conoce como **fase G₀** y se caracteriza por ser reversible, permitiendo a las CMHs proliferar y diferenciarse para regenerar la hematopoyesis en función de los estímulos presentes en el organismo.

La **senescencia** es un proceso de diferenciación terminal en el que se activan barreras que bloquean la progresión del ciclo de manera irreversible (Goldstein, 1990). Estudios *in vitro* han demostrado que esta parada puede darse en fase G₁ o G₂ (Sherwood et al., 1988) y suele ir acompañada por cambios morfológicos y bioquímicos: aumento del tamaño celular (Sherwood et al., 1988), compactación de la cromatina, tinción positiva para la β -Galactosidasa a pH subóptimo y activación de factores de transcripción como p15/INK^{4b}, p16/INK^{4a} y p19/ARF (Serrano et al., 1996). La senescencia celular es parte del proceso normal de diferenciación de las células en su tejido que contribuye al mantenimiento de los mismos. La senescencia también puede activarse en respuesta a una proliferación celular intensiva (Allsopp et al., 2001), reducción de los telómeros (Jacobs and de Lange, 2004) o daño celular (Yahata et al., 2011).

Existen evidencias de que la senescencia producida por la activación de rutas de control como p53 y p16/INK^{4a} domina sobre los procesos artificiales para la alteración de la diferenciación que se explican a continuación (Li et al., 2009; Marion et al., 2009).

5.2.- ALTERACIÓN DEL GRADO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR

Originalmente se pensó que en el proceso de maduración las células adquirirían un compromiso con su tipo tisular en el que perdían habilidades e incluso “genes” a favor de una mayor especialización y diferenciación. No obstante, los experimentos pioneros de **transferencia nuclear** en anfibios (*Rana pipiens*), llevados a cabo por Briggs y King, dejaron claro que no existía una pérdida de ADN sino una regulación de la expresión génica (Briggs and King, 1952). En su trabajo, emplearon núcleos de células con una alta especialización que embebieron en un entorno rico en factores de transcripción del citoplasma de oocitos fecundados, que los hizo capaces de reproducir el desarrollo normal de nuevos individuos.

La técnica de la transferencia nuclear ha aportado evidencias de que el silenciamiento que experimentan ciertos genes durante la maduración es un proceso regulado. Este silenciamiento puede ser revertido por ciertos factores presentes desde el oocito hasta los primeros estadios de la blástula en anfibios (Gurdon, 1962).

No obstante, para reproducir estos experimentos en mamíferos hubo que esperar hasta 1997, cuando la transferencia nuclear fue capaz de generar a la popular oveja *Dolly* (Wilmut et al., 1997).

Además de la transferencia nuclear también se puede alterar el estado transcripcional mediante la **fusión celular**, descrita por primera vez en 1983 (Blau et al., 1983), por la que se generan heterocariontes senescentes. Gracias a la fusión celular pudimos comprender que el estado embrionario era dominante. Es decir, que tras la fusión los factores que rigen la expresión en las ESCs pueden inducir un perfil transcripcional más primitivo en las células diferenciadas (Tada et al., 1997). A través de la fusión con ESCs, incluso en células terminalmente diferenciadas como los linfocitos, se induce un estado de pluripotencia (Pereira et al., 2008).

5.3.- LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS

El hecho de que ciertos factores presentes en las ESCs se impusieran sobre el resto de factores característicos que rigen el estado de diferenciación de las células motivó una búsqueda de los factores individuales que lideraban este fenómeno. En 2006, un artículo firmado por Takahasi y Yamanaka resolvía la incógnita (Takahashi and Yamanaka, 2006). En su trabajo, partiendo de los 24 principales factores diferencialmente expresados en células ES, reducían a sólo 4 el número de factores necesarios para generar iPSCs (*induced Pluripotent Stem Cells*) a

partir de fibroblastos de ratón. Estos factores son *Klf4*, *Oct3/4* (*Pou5f1*), *Sox2* y el proto-oncogén *c-Myc*, figura 9.

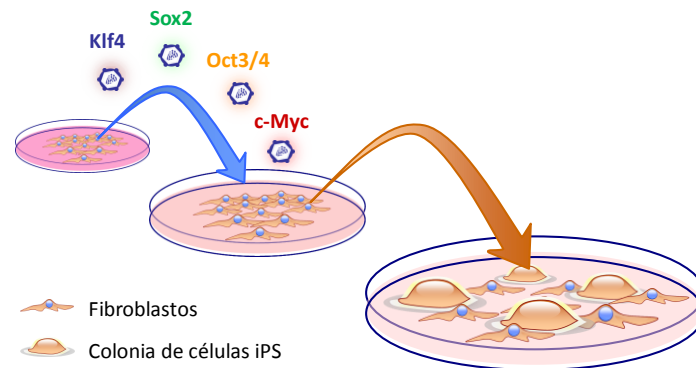


Figura 9.- Representación de la reprogramación celular propuesta por S. Yamanaka. El proceso se inicia por la transducción simultánea de fibroblastos con un juego de vectores retrovirales portando los genes *Klf4*, *Sox2*, *Oct3/4* y *c-Myc*, siendo este último prescindible. La expresión ectópica produce cambios transcripcionales que propician la aparición de colonias con morfología de células ES.

Un acierto de su experimento fue el empleo de RVs para forzar la expresión ectópica de los genes de forma temporal, ya que los esqueletos retrovirales eran reconocidos por la maquinaria celular y silenciados conforme las células se “reprogramaban”. De esta manera, los factores disparaban un estado estacionario pluripotente que se mantenía en las iPSCs por la reactivación de la maquinaria endógena propia (Sridharan et al., 2009). Un gran número de publicaciones confirmaron estos resultados en ratón y humano empleando los mismos factores o combinaciones solapantes (*LIN28* y *NANOG* sustituyendo a *Klf4* y *c-Myc* parecen mejorar la generación de iPSCs humanas) (Okita et al., 2007; Takahashi et al., 2007; Wernig et al., 2007; Yu et al., 2007).

5.3.1.- Aspectos a mejorar en la generación de iPSCs

Algunos frentes abiertos son la seguridad (Pera, 2011), la eficacia de generación y la diferenciación. En cuanto a seguridad, las mutaciones que se pueden generar por la manipulación y expansión *in vitro* de estas células son uno de sus puntos débiles (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011). A esto se suma la polémica que han suscitado ciertos grupos que aseguran que estas células conservan cierta memoria epigenética, que podría influir en su comportamiento y diferenciación (Kim et al., 2010; Polo et al., 2010; Kim et al., 2011a; Kajiwarra et al., 2012). Para mejorar la **eficacia de reprogramación** se han generado vectores optimizados de reprogramación más seguros (Sommer et al., 2009; Yusa et al., 2009; Sommer et al., 2010). Una barrera importante que evita la reprogramación es la ruta del **supresor tumoral p53**, en cuya ausencia aumenta el número de colonias y se acortan los tiempos de generación de iPSCs (Li et al., 2009; Marion et al., 2009). Otro obstáculo a salvar es la diferenciación al tejido de interés de la iPSC. Aunque se conoce bastante sobre las elecciones que van definiendo el destino de las ESCs e iPSCs hasta prácticamente todos los tejidos del organismo (Williams et al., 2012), aún faltan protocolos optimizados de diferenciación a escala clínica.

5.3.2.- Perspectivas futuras de las iPSCs

Una vez que se hayan solventado estos aspectos, las iPSC podrán satisfacer las esperanzas que han levantado en el campo de la **medicina regenerativa** y la **investigación médica**

individualizada, al poseer unas características de ESCs pero sin la carga ética de estas. Las iPSCs pueden ser generadas de manera específica para cada paciente y tienen un comportamiento similar, si no igual, al de las ESCs del organismo del que provienen. Esto las convierte en unas magníficas candidatas como fuente ilimitada de células para tratamientos clínicos, añadiendo las ventajas del trasplante autólogo a la mejoría que pudieran producir las células derivadas de ESCs/iPSCs. También, son una excelente fuente de células para comprobar nuevos fármacos de manera individualizada y así poder estudiar variaciones en el metabolismo y toxicidad tras el tratamiento con los mismos (Nsair and MacLellan, 2011).

5.3.3.- Las células iPS como modelo de estudio de enfermedad

Una de las aplicaciones más interesantes es el uso de estas iPSCs generadas a partir de pacientes para generar modelos de enfermedad sobre los que investigar tanto los efectos de la enfermedad como posibles terapias. Las iPSCs ya se han generado a partir de muestras biológicas de pacientes (Park et al., 2008), de manera que pueden establecerse líneas de iPSCs que permitan estudiar la toxicidad/efectividad de fármacos tradicionales o incluso nuevas estrategias de corrección génica (Raya et al., 2009; Soldner et al., 2009; Camnasio et al., 2012). Además, las iPSCs presentan una mayor tasa de reparación por recombinación homóloga que las células adultas (Buecker et al., 2010) por lo que son una diana ideal de terapias de **modificación genética dirigida** (Lombardo et al., 2007; Buecker et al., 2010; Nakayama, 2010).

Esto es especialmente importante en el estudio de enfermedades raras, originadas por mutaciones poco frecuentes. Además, el proceso de reprogramación puede evidenciar un conflicto entre la deficiencia y los mecanismos de remodelado epigenético y renovación, como ha ocurrido cuando se han intentado reprogramar células deficientes en algunas rutas de reparación del ADN. Ejemplos son el caso de la **anemia de Fanconi** (Raya et al., 2009; Raya et al., 2010; Muller et al., 2012; Papapetrou, 2012), proteínas de la **ruta NER** (*Nucleotide Exchange Repair*) (Fong et al., 2011) o incluso **ATM** (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Kinoshita et al., 2011; Nitta et al., 2011). Aunque ya se han generado numerosas iPSC de muchas enfermedades genéticas relacionadas con defectos en la reparación del ADN, algunas rutas tan relevantes como la **NHEJ**, con proteínas implicadas tan importantes como LigIV, RAG1, RAG2, Artemis o la **DNA-PK**, están aún por explorar.

IV.- OBJETIVOS

En la presente memoria nos hemos planteado dos grandes objetivos, cada uno de los cuales engloba tres objetivos parciales que se muestran a continuación:

1.- Evaluación *in vivo* de la eficacia y seguridad de la terapia génica de ratones deficientes en el gen *Fanca* mediante el empleo del vector lentiviral PGK *FANCA wPRE (*FANCA*-LV) diseñado para su aplicación clínica en pacientes con anemia de Fanconi A.**

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos parciales:

- Comprobar la eficacia y toxicidad de la transducción *ex vivo* de células madre y progenitores hematopoyéticos *Fanca*^{-/-} con el vector *FANCA*-LV.
- Investigar el beneficio terapéutico de la terapia génica con el vector *FANCA*-LV en el modelo de ratón deficiente en el gen *Fanca*^{-/-}.
- Evaluar *in vivo* el riesgo genotóxico asociado a la terapia génica de ratones *Fanca*^{-/-} empleando el vector *FANCA*-LV.

2.- Analizar la implicación de la ruta de reparación NHEJ en la reprogramación de células adultas para generar células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos parciales:

- Comprobar la capacidad de fibroblastos embrionarios de *Prkdc*^{scid} para generar células iPS mediante el uso de vectores virales y no virales de reprogramación celular.
- Investigar qué factores determinan los defectos de reprogramación de fibroblastos embrionarios *Prkdc*^{scid}.
- Caracterizar la pluripotencia y sensibilidad a radiaciones ionizantes de células iPS homocigotas para la mutación *Prkdc*^{Scid}.

V.- OBJECTIVES

In this thesis, we aimed to focus on two main goals, each of them included the three partial objectives listed below:

1.- To evaluate the *in vivo* efficiency and safety of a gene therapy approach aiming the *Fanca* deficient cells transduced with a PGK *FANCA* wPRE* lentiviral vector (*FANCA*-LV) devised for the treatment of Fanconi anemia A patients.

To achieve this goal, we have set the following intermediate objectives:

- To test the efficacy and toxicity of the *ex vivo* transduction of *Fanca*^{-/-} hematopoietic stem and progenitor cells using the *FANCA*-LV.
- To investigate the therapeutic benefit of the *FANCA*-LV mediated gene therapy in a *Fanca*^{-/-} mouse model.
- To evaluate the *in vivo* the genotoxic risk, associated to the gene therapy of *Fanca*^{-/-} mice using the *FANCA*-LV.

2.- To analyze the implications of NHEJ in the reprogramming of adult cells to generate induced pluripotent stem cells (iPS).

For this purpose, we have addressed the following partial goals:

- To test the ability of *Prkdc*^{scid} embryonic fibroblasts to generate iPS cells after delivery of the reprogramming factors using viral and non-viral vectors.
- To investigate the critical factors involved in the deficient reprogramming of *Prkdc*^{scid} embryonic fibroblasts.
- To characterize the pluripotency and sensitivity to ionizing radiation of iPSCs homozygous for the *Prkdc*^{scid} mutation.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

1.- ANIMALES

Todos los animales fueron mantenidos y tratados conforme con la legislación nacional y europea (RD 1201/2005 del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación para la protección y el uso de animales de experimentación científica; Ley 32/2007, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio; Convención Europea ETS 123 para el uso y la protección de mamíferos vertebrados empleados en experimentación y otros usos científicos). Atendiendo siempre a las recomendaciones de la SECAL (Sociedad Española para las Ciencias del Animal de Laboratorio), así como las de su equivalente europeo FELASA (Nicklas et al., 2002; Voipio et al., 2008).

Los ratones fueron estabulados en las instalaciones propias del centro (número de acreditación 28079-21A) en condiciones ambientales controladas: temperatura constante de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $55\pm 10\%$ y ciclos de 12 h de luz/oscuridad. Los animales gozaron de acceso ilimitado a agua de bebida esterilizada y filtrada (mediante tratamiento con luz ultravioleta y filtros $\varnothing=50\text{ }\mu\text{m}$), así como a comida (UAR D04).

1.1.- CEPAS EMPLEADAS

1.1.1.- Ratones FVB *wild-type* y *Fanca*^{-/-}

El modelo de ratón empleado como modelo de AF ha sido descrito en publicaciones científicas previas (Cheng et al., 2000; Rio et al., 2002). En el modelo de terapia génica en ratón se emplearon ratones singénicos FVB/129 *Fanca* ^{$\Delta\text{E4-E7.LacZNeo}$} (referidos como *Fanca*^{-/-}). Estos ratones poseen un casete de resistencia a neomicina reemplazando los exones 4-7 del gen que codifica la proteína FANCA. Los fundadores de nuestra colonia fueron obtenidos del Dr. Fre Arwert, departamento de Genética Clínica y Genética Humana de la Free University, Amsterdam (Holanda). Para obtener los animales de experimentación se cruzaron ratones heterocigotos y se genotiparon todos los miembros de cada camada mediante qPCR. Los ratones *Fanca*^{-/-} homocigotos tenían entre 12-16 semanas de vida al inicio de los experimentos aquí referidos. Como controles, se utilizaron ratones con genotipo *wild-type* (wt) de la misma camada.

1.1.2.- Ratones BALB/c *wild-type* y *Scid*

En los experimentos de reprogramación se emplearon ratones control, BALB/c wt (BALB/c JHan® Hsd), e inmunodeficientes, BALB/c *scid* (BALB/c JHan® Hsd-*Prkdc*^{*scid*}). Estos últimos poseen una mutación en el gen *Prkdc* que codifica para la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de ADN (DNA-PKcs) (Bosma et al., 1983). La colonia *Scid* fue obtenida de los laboratorios Harlan (<http://www.harlan.com>) y perpetuada mediante cruces en homocigosis. Los ratones inmunodeficientes fueron mantenidos en condiciones estériles dentro de armarios aisladores con ventilación independiente.

1.1.3.- Ratones NSG

Los ratones inmunodeficientes han sido ampliamente empleados como modelos de xenotrasplante porque carecen de los mecanismos inmunes para rechazar células extrañas (Kamel-Reid and Dick, 1988; McCune et al., 1988; Phillips et al., 1989). Para la generación de teratomas se inocularon células ES/iPS en ratones inmunodeficientes NOD.Cg-*Prkdc*^{*scid*}

Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ, referidos por las siglas NSG, procedentes de los laboratorios Jackson (www.JAX.org). La colonia fue mantenida mediante cruces en homocigosis y los ratones fueron criados en armarios aisladores bajo condiciones de esterilidad.

1.2.- EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Todos los procedimientos aquí reflejados fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CEE/CIEMAT, código de aprobación HEM2/09 y HEM5/09) que rige las actuaciones dentro de las instalaciones de cría y experimentación animal del centro.

Al menos 2 veces por semana los animales fueron analizados *de visu* atendiendo a pigmentación de la piel, postura y comportamiento. Se consideró motivo de sospecha la coincidencia de al menos dos de las siguientes condiciones: falta pigmentación en cara, orejas, cola o manos; postura encorvada; aparición de bultos o deformidades; anergia o estereotipias. En determinados casos también se empleó el peso como indicador de salud.

1.2.1.- Evaluación Hematológica

Sangrados rutinarios: Para la evaluación rutinaria del estado hematológico de los ratones se extrajeron entre 100 y 200 µl de sangre de la vena lateral de la cola de los ratones. La sangre se mezcló en el momento con 20 µl de anticoagulante (EDTA 0,5 M pH=8,0) en tubos de polipropileno de 1,5 ml (DASLAB) y fue analizada en el mismo día.

Extracción de sangre total: En los análisis a término, los animales fueron anestesiados con 17 µl/gr de una solución de avertina al 2,5%, inyectada vía intraperitoneal. Una vez anestesiados, procedimos a extraer la sangre total (entre 800 y 1.200 µl) de la arteria subaxilar. La sangre fue mezclada inmediatamente con 50 µl de anticoagulante en tubos de 1,5 ml. Para evitar un sufrimiento innecesario, los animales fueron eutanasiados mediante dislocación cervical una vez extraída la sangre y estos ratones se utilizaron para la extracción de otros órganos hematopoyéticos. Las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente (TA) hasta su procesamiento el mismo día.

Análisis hematológicos: Se realizó un seguimiento rutinario del recuento de glóbulos rojos y blancos en las sangres de los ratones trasplantados. A partir de la sangre de la vena de la cola obtuvimos los recuentos sanguíneos en un analizador hematológico Abacus Junior Vet (PRACTICE CVM SLL). Cuando los recuentos hematológicos fueron superiores al umbral de normalidad (12×10^6 leucocitos/ml) se confirmó el número total de células contando en cámara de *Neubauer* (Nageotte, Brand Germany Blaubrand). Empleamos una dilución 1:40 de la sangre en solución de Türk para recuento leucocitario (MERK). El resto de las muestras se reservó para el estudio de extensiones de sangre y extracción de ADN.

1.2.2.- Extracción de órganos hematopoyéticos

La hematopoyesis intramedular es la principal fuente de progenitores hematopoyéticos en ratones adultos y prácticamente la única en los seres humanos, también adultos (Morrison et al., 1995). Para evaluar este compartimento celular y para los experimentos de trasplante extrajimos células de la MO.

Extracción de MO: Acorde con los procedimientos autorizados, los animales donadores de MO fueron sacrificados en una cámara de CO₂ si eran donantes de MO para experimentación o por dislocación cervical tras su sangrado en los análisis a término. Acto seguido, se extrajeron

quirúrgicamente los huesos largos de las extremidades posteriores (fémur y fíbula). Los huesos limpios, desprovistos de músculos y tendones, se mantuvieron en PBS (Dulbeccos' phosphate saline buffered. SIGMA). En condiciones estériles, perfundimos los huesos con 1 ml por ratón de medio IMDM (Iscove's modified Dulbeccos' medium + Glutamaxtm –I. Gibco) y disgregamos la MO empleando jeringuillas estériles desechables de polipropileno de 1 ml (Icoplus 3®, Novico Medica) provistas de agujas de 25 G de diámetro (BD Microlance 3, 25 G 5/8", BD). Antes de continuar se contó el número de células en una cámara *Neubauer* diluyendo las células 1:40 en la solución de Türk.

Punción de MO: La punción de MO permite evaluar el quimerismo de la MO en experimentos de trasplante sin necesidad de sacrificar a los ratones. Primero los animales fueron anestesiados inyectando vía intraperitoneal 125 mg/Kg de ketamina (Ketolar, Pfizer-Parke Davis) conjuntamente con 10 mg/Kg D-metadomidina (Dexdomitor, Laboratorios Esteve Veterinaria). Una vez que la pérdida del reflejo plantar hizo evidente la acción de la sedación, se aspiró la MO mediante una punción supra-rotuliana atravesando la epífisis del fémur. Para esta operación se emplearon jeringuillas estériles de 1 ml con agujas de 25 G. El contenido de la MO se homogeneizó con ayuda de la jeringuilla en 0,2 ml de PBS estéril. A partir de este punto las suspensiones de MO se procesaron igual que la MO perfundida. Seguidamente, el punto de incisión se esterilizó con povidona yodada (Betadine, Meda Farma) y permitimos que los ratones se recuperaran de la anestesia sobre mantas térmicas tras administrarles 50 mg/Kg de atipamezol (Antisedan Laboratorios Esteve Veterinaria). Una vez recuperada su movilidad normal, los animales se devolvieron a sus jaulas donde terminaron de recuperarse de la operación.

Extracción de órganos hematopoyéticos extramedulares: En los experimentos de trasplante de células hematopoyéticas, llegados a término, extrajimos no sólo la MO sino también otros tejidos capaces de desarrollar hematopoyesis extramedular. En los ratones, estos son principalmente el bazo y el timo (Morrison et al., 1995). Todos los órganos fueron sometidos a una evaluación macroscópica. Además, bazo y timo se homogeneizaron en PBS, haciéndolos pasar por una aguja de 18 G (18 G x 1^{1/2}", 1,2 x 40 mm. Teruno) y luego a través de agujas de 25 G. Esta suspensión celular se empleó para caracterizar los órganos por citometría de flujo y también para extraer ARN/ADN de alícuotas congeladas a -80°C.

1.2.3.- Purificación y trasplante de células madre hematopoyéticas

Purificación de progenitores hematopoyéticos: Los progenitores con capacidad de repoblación a largo plazo carecen de muchas proteínas de superficie presentes en las células de la sangre, sin embargo las células maduras sí presentan estos marcadores de superficie específicos de linaje (Jordan and Lemischka, 1990; Morrison et al., 1995). La suspensión de la MO (ver apartado V.1.2.2) fue desprovista de las células maduras empleando un kit comercial de depleción inmunomagnética (Lineage cell depletion kit Mouse, Miltenyi Biotec). Seguimos el protocolo del kit, este emplea un juego de anticuerpos biotinilados que reconocen las moléculas: CD5, CD45, CD11b, Ly6G/C, 7-4 y Ter119. Después los anticuerpos son acomplejados con bolas magnéticas tapizadas con estreptavidina. La mezcla resultante se separó mediante columnas ferromagnéticas "LS" (MACS, Miltenyi Biotec), acopladas a un sistema de imanes QuadroMACS (MACS, Miltenyi Biotec). Para determinar la pureza del eluido, marcamos una alícuota con anticuerpos marcados con ficoeritrina (PE) contra CD3, B220, CD11b, Ly6 G y Ter119 y lo analizamos por citometría de flujo. Regularmente se obtuvieron purezas superiores a un 70% de células negativas a los marcajes anteriores.

Trasplante de progenitores hematopoyéticos: El trasplante de células hematopoyéticas en individuos irradiados con dosis letales tiene un efecto radio-protector gracias a que los progenitores pueden formar parte estructural y funcional de los tejidos hematopoyéticos dañados (Ford et al., 1956). Se trasplantaron células lin⁻ transducidas o MO total de receptores primarios inyectándolas en la vena lateral de la cola de ratonas *Fancc*^{-/-} previamente acondicionadas mediante 2 dosis de 5 Gy espaciadas 24 h entre sí. Las irradiaciones se llevaron a cabo en instalaciones propias del CIEMAT con un equipo de rayos-X MG324 (Philips) irradiando a una tasa de 1,07 Gy/min. Para ajustar la dosis de células, primero se determinó la celularidad de las suspensiones procedentes de los cultivos de lin⁻ o de los homogeneizados de MO. Cada receptor fue inoculado vía vena lateral de la cola con un volumen de 200 µl, empleando jeringuillas provistas de agujas de 25 G de diámetro.

1.2.4.- Extracción de fibroblastos embrionarios de ratón

En los experimentos de reprogramación celular partimos de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Para ello, se pusieron a cruzar parejas wt x wt, Scid x Scid o wt x Scid. La mañana de aparición del tapón vaginal fue registrada como E0,5. Los cuernos uterinos conteniendo los embriones E13,5 se aislaron y se embebieron en PBS. Los embriones se separaron del útero y la placenta a la vez que fueron lavados en PBS estéril. Una vez desprovistos de la porción anterior y del hígado fetal, el tejido embrionario fue lavado en PBS y disgregado mecánicamente antes de proceder a una digestión de 6 h a 37°C, con agitación eventual, en una solución de tripsina 0,05% (Gibco). Los fibroblastos del tejido sin digerir se dejaron decantar y después las células se resuspendieron en medio pMEF: DMEM 2 nM Glutamax (Dulbecco's modified Eagle's medium (1X) + GlutaMAX[®] -I. Gibco), 15% de FBS (Foetal Bovine Serum. Lonza) y 0,5% de antibiótico (PenStrep: 10.000 Units Penicillin, 10.000 µg Streptomycin. Gibco). Acto seguido, las células fueron sembradas en botellas de 75 cm² (NUNCLON™ Δ surface. Nunc). A la mañana siguiente las células no adheridas fueron eliminadas aspirando el medio que fue repuesto a continuación. Este cultivo se consideró "pase 0" y se expandió mediante pases seriados sin permitir que los cultivos alcanzasen confluencia.

2.- CULTIVOS CELULARES

Los cultivos de células adherentes o en suspensión se mantuvieron en condiciones de esterilidad dentro de las instalaciones de cultivos celulares del CIEMAT (número de registro rla 262. Red de Laboratorios. Sistema Madri+d). Estas instalaciones han sido notificadas y autorizadas para la manipulación de OMGs (Notificación A/ES/4/I-04 y A/ES/5/06 para el uso de RVs y LVs, respectivamente). Todas las manipulaciones se realizaron dentro de la zona de seguridad dentro de las campanas de flujo laminar (BIOULTRA. Telstar).

2.1.- CULTIVO DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS

Cultivo líquido: Las células hematopoyéticas procedentes de la MO total o la fracción lin⁻ obtenida por selección negativa fueron crecidas en suspensión en placas multi-pocillo de cultivos no tratadas M6 (Multiwell™, 6 well polystyrene. FALCON). Las células fueron resuspendidas según el experimento en medio IMDM con suero (IMDM; 10% de FBS; 0,5% de antibiótico) o en medio libre de suero (StemSpan, StemCell Technologies Inc., conteniendo un 0,5% de PenStrep). Estos cultivos siempre se suplementaron con el factor de células madre de ratón (mSCF) y con interleuquina-11 humana (hIL11) (100 ng/ml, ambas de Preprotech). Las células se sembraron a

una concentración de 50.000 células/ml y fueron rutinariamente pasadas cada 3-7 días en función de su tasa proliferativa.

El cultivo de células previo a la transducción con RVs: pre-estimulación, se hizo cultivando previamente las células en las mismas condiciones descritas en el párrafo anterior durante 48 h.

Cultivos clonogénicos: Para la evaluación del contenido y/o el estado de los progenitores hematopoyéticos *in vitro*, se establecieron cultivos clonogénicos en medio semisólido rico en citoquinas específicas para el crecimiento de progenitores CFU-GM. Para establecer los estod cultivos clonogénicos sembramos 1.000 y 3.000 células lin⁻ o 10.000 y 30.000 células de MO total. Resuspendimos las células en 1 ml de metilcelulosa conteniendo citoquinas para progenitores de ratón (Methocult® GF 3534. STEMCELL Technologies) y depositamos 1 ml por placa de 35 mm de diámetro (Nuncclon™ Δ Surface. NUNC). Empleamos la concentración celular más baja para establecer el contenido basal de progenitores y varias placas con la concentración más alta para evaluar la sensibilidad a agentes tóxicos, como por ejemplo MMC. Una semana después se empleó un microscopio invertido para contar el número de colonias. En los experimentos de marcaje genético con proteínas fluorescentes también se pudo determinar de esta manera la eficacia de transducción sobre progenitores hematopoyéticos.

2.2.- CULTIVO DE CÉLULAS ADHERENTES

2.2.1.- Cultivo de líneas celulares

Recurrimos al uso de líneas celulares inmortalizadas artificialmente como herramienta para la producción y titulación de SNs virales (SN). Empleamos la línea humana derivada de riñón embrionario HEK 293T (ATCC-CRL-11268) para producir SNs porque esta línea es fácilmente transfectable. Titulamos los SNs producidos con envueltas compatibles con células humanas en la línea de fibroblastos humanos HT1080 (ATCC CCL-121) y las envueltas dirigidas contra ratón se titularon en la línea 3T3 (ATCC CCL-92).

Crio-preservación: La crio-preservación celular permite mantener células individuales en suspensión en un estado reversible de parada metabólica.

Cuando se decidió congelar los cultivos, las células fueron resuspendidas en 0,5-1,0 ml de una solución al 40% de FBS y 10% de DMSO (Dimethyl sulphoxide, SIGMA) en tubos de congelación de 1,5 ml (Cryotube™ Vials, nucn) y acto seguido introducidos en un recipiente de criopreservación (Cryo 1°C Freezing container. Nalgene) relleno de Isopropanol (2-propanol. Scharlau). Las muestras fueron congeladas gradualmente dejando el recipiente una noche a -80°C. Al día siguiente, los criotubos se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido a -198°C (77,2 K).

En el momento de la descongelación, los viales cerrados se sumergieron en un baño de agua a 37°C hasta que el 50% del volumen se hizo líquido. Inmediatamente, se rociaron con etanol y, dentro de la cabina, su contenido fue trasvasado sobre tubos de 15 ml donde el DMSO fue diluido añadiendo gota a gota medio atemperado. Una vez lavado este medio, las células se resuspendieron en su medio de cultivo. Las células fueron sembradas sobre placas tratadas para cultivo tisular que dejamos incubar en las estufas a 37°C.

Sub-cultivo de líneas inmortalizadas: Para la propagación de líneas celulares adherentes se emplearon placas y botellas estériles de poliestireno tratadas para cultivo celular (COSTAR). Si no se indica lo contrario las células se crecieron en medio Dulbeccos' suplementado: DMEM (DMEM (1X) + GlutaMAX® -I. Gibco) suplementado con 10% de FBS y 0,5% de antibiótico. Filtramos siempre el medio por membranas de poliéter sulfona (PES) con un tamaño de poro de 0,1 µm

(Express Plus 0,1 μm . Millipore). Los cultivos se mantuvieron en estufas calefactadas a 37°C con una presión de CO₂ constante del 5% (Series 8000 WJ CO₂ incubator, Thermo Scientific).

2.2.2.- Cultivo de células primarias

Además de los cultivos primarios establecidos en el laboratorio, en este apartado consideramos los MEFs C57BL/6 obtenidos de la ATCC (ATCC-SCRC-1008) que sirvieron como co-cultivo de soporte para el cultivo de ESC/iPSC. La manipulación de estas células se realizó como se ha descrito en el apartado anterior con las siguientes puntualizaciones:

Estromas de soporte: El cultivo de ESCs/iPSCs es delicado y requiere del co-cultivo de las células embrionarias con estromas de soporte o “feeder” que dan apoyo estructural y nutricional a las ESCs/iPSCs. Para generar los cultivos de soporte amplificamos MEFs C57BL/6 primarios que obtuvimos de la ATCC (ATCC-SCRC-1008). Cuando los cultivos se encontraban cerca del 70% de confluencia, las células fueron *tripsinizadas*, resuspendidas en medio sin suero y concentradas en tubos de 50 ml (FALCON). Los tubos fueron irradiados con 60 Gy en instalaciones propias del CIEMAT (IR-04) con un equipo de Rayos-X MG324 (Philips), a una tasa de irradiación de 1,07 Gy/min. Acto seguido, las células fueron centrifugadas de nuevo y resuspendidas en medio de congelación para su crio-preservación.

Criopreservación: Las células procedentes de 2 placas de 150 mm irradiadas o media placa de 150 mm en el caso MEFs primarios fueron resuspendidas en 0,5 ml de medio. A esta suspensión celular se le añadió gota-a-gota 0,5 ml de una solución de congelación 2x conteniendo un 80% de FBS y un 20% de DMSO en viales de congelación de 1,5 ml.

Cada vial de células de soporte descongelado sirvió para tapizar a confluencia la superficie de 2-3 placas de 90 mm de diámetro. Cada vial de MEFs de pase 1 fue sembrado en una placa de 150 mm de diámetro.

Amplificación de cultivos celulares primarios: Las células se crecieron en medio pMEF: medio DMEM suplementado con un 15% de FBS y un 0,5% de antibiótico, filtrando la mezcla por membranas de 0,1 μm , para asegurar su esterilidad. Los cultivos se mantuvieron en estufas calefactadas a 37°C con una presión de CO₂ constante del 5% y concentraciones constantes de O₂ del 5% en los cultivos crecidos en estufas dotadas de hipoxia. Estas células fueran crecidas evitando que alcanzasen confluencia y amplificadas mediante pases 1:4 ó 1:7 según su proliferación empleando tripsina 0,25%.

2.2.3.- Cultivo de células madre embrionarias y células madre pluripotentes inducidas

Empleamos como línea de referencia la línea mES J1. Esta línea fue derivada de un embrión macho de la cepa 129S4/SvJae. La línea fue obtenida de la colección americana de tejidos celulares (ATCC, referencia SCRC-1010). Para poder emplearla como control de pluripotencia de las líneas iPSC generadas en el laboratorio, todas se mantuvieron conforme a las recomendaciones de la ATCC.

Propagación de líneas embrionarias sobre feeder: Amplificamos los cultivos ESCs/iPSCs en medio mES elaborado con medio DMEM KO (KnockOut™ DMEM. Gibco), suplementado con 15% de suero semisintético (Hyclone. ThermoScientific), 1% de aminoácidos no esenciales (NEAA 100X. Lonza, Biowhittaker), 1% de Glutamina (GlutaMAX®, Gibco), 1% de PenStrep, 50 μM de 2- β -mercaptoetanol (2-Mercaptoethanol 50 mM. Gibco) y 1.000 U/ml de LIF (Leukemia Inhibitory Factor, ESGRO 10⁷ U/ml. Millipore). El medio fue reemplazado todos los días por medio mES fresco. Las células crecieron sobre una monocapa de fibroblastos de soporte irradiados formando

colonias redondeadas y refringentes de bordes bien definidos. Se vigiló diariamente que los cultivos no perdieran su morfología característica embrionaria. Los cultivos se pasaron mediante una tripsinización suave (0,25% Trypsin-EDTA 1X. Gibco) seguida de una dilución 1:10-1:20 de las células homogenizadas. Las ESCs/iPSCs proliferan activamente por lo que fueron subcultivadas cada 2-3 días.

Cultivos de líneas embrionarias sin estromas de soporte: Como paso previo a análisis por citometría, extracción de ADN/ARN o inyección en ratones NSG, las células se crecieron en ausencia de un cocultivo de soporte durante al menos 2 pases consecutivos con la finalidad de aumentar la pureza de ESC/iPSCs y evitar la contaminación con células adultas. Se emplearon placas multipocillo para cultivos celulares M6, pretratadas a TA durante 30 min con una solución 0,1% (w/v) de gelatina (EIA Grade Reagent, Gelatine. BIO-RAD) filtrada por una membrana con un tamaño de poro de 0,1 μ m (MILLEX VV, PVDF membrane. Millipore Express). El medio mES empleado para el mantenimiento de estos cultivos en gelatina fue previamente acondicionado durante 24 h sobre un cultivo confluyente con fibroblastos de soporte irradiados: se acondicionaron 8 ml por placa de 100 mm (Cell culture dish 100 mm x 20 mm style. Corning). Las líneas de ESC/iPSCs fueron amplificadas mediante digestión suave con tripsina (Trypsin 0.25% EDTA 1X, SIGMA), inactivada con FBS al 10% y las células diluidas en medio fresco se sembraron sobre placas estériles nuevas, pretratadas con gelatina.

3.- VECTORES

3.1.- AMPLIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS

3.1.1.- Transformación de bacterias

Los plásmidos fueron amplificados en bacterias *E. coli* competentes (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli*. Invitrogen). Los lotes de TOP10 competentes químicas fueron preparados en el laboratorio a partir de cultivos axénicos. Incubamos las bacterias, en crecimiento exponencial, con la solución CM1 en hielo (10 mM de NaOAc pH 5,6; 50 mM de $MnCl_2$ y 5 mM de NaCl) y congelamos alícuotas de estas bacterias competentes en la solución CM2 (10 mM de NaOAc pH 5,6; 70 mM de $MnCl_2$; 5 mM de NaCl y 5% en volumen de glicerol).

Se emplearon rutinariamente 500 ng de plásmido de interés en cada transformación. El ADN se mezcló con las bacterias y una vez incorporado el plásmido mediante choque térmico se permitió que las bacterias se recuperaran en 1 ml de medio LB sin antibióticos durante 1-2 ciclos de replicación (40-60 min). A continuación, 100 μ l del volumen anterior fueron esparcidos sobre placas de LB-agar con los antibióticos ampicilina (50 μ g/ml) o kanamicina (25 μ g/ml), según la resistencia del plásmido. Incubamos las placas *petri* 16 h a 37°C y a la mañana siguiente examinamos las placas en busca de colonias individuales de bordes definidos, resultado de la transformación de la resistencia al antibiótico.

3.1.2.- Comprobación de los plásmidos

Picamos colonias individuales y las sembramos en 4 ml de medio LB con ampicilina o kanamicina para crecer a 37°C y en agitación. Tras 16 h recuperamos estos minicultivos confluentes. Reservamos un mililitro a 4°C y los otros 3 ml de cada *mini* fueron precipitados en minicentrífugas de mesa Eppendorf (Centrifuge 5415) a 13.000 rpm durante 1 min. Purificamos el ADN plasmídico en 50 μ l empleando un kit comercial: Manual FastPlasmid™ Mini Kit (5 Prime). A

partir de su secuencia original (real o putativa) en formato FASTA (.doc) o GeneBank (.gb) visualizamos las posibles combinaciones de enzimas de restricción informativas en el software VectorNTI. Las digestiones elegidas se realizaron a partir de 1-4 µl del ADN de la *mini* en un volumen de 20 µl, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todas las enzimas y sus tampones de digestión los obtuvimos de New England Biolabs. Tras 1 h de digestión a la temperatura óptima de cada enzima, los fragmentos de restricción se resolvieron en geles de agarosa al 0,8-1,0% (AGAROSE D1, LOW EEOO. Conda).

3.1.3.- Purificación de plásmidos para transfección de células eucariotas

Los mini-cultivos a 4°C que pasaron satisfactoriamente su comprobación fueron amplificados y diluidos 1:1000 en 250 ml de medio LB con los antibióticos adecuados y creciendo los cultivos toda la noche a 37°C en agitación (300 rpm). A la mañana siguiente, las bacterias fueron precipitadas por centrifugación a 9.000 rpm durante 15 min en un rotor JA-12 CONICAL (Beckman Coulter) acoplado en una centrífuga Beckman (Avantis™ J-30i Centrifuge. Beckman Coulter). El precipitado fue entonces procesado con un kit comercial: Endofree Plasmid Maxi kit (Endofree® Plasmid Maxi kit. Qiagen). El plásmido libre de endotoxinas fue finalmente resuspendido en agua destilada MilliQ filtrada por un dispositivo de filtro BioPack® (Millipore). La concentración final del ADN plasmídico se midió con un espectrofotómetro (ND-1000. NanoDrop®) y el ADN se almacenó a -20°C a una concentración de 1 µg/µl. Las *maxis* fueron igualmente sometidas a distintas digestiones enzimáticas para comparar sus patrones de restricción con los del plásmido original.

3.2.- VECTORES RECOMBINANTES

Por motivos de seguridad, en la producción de RVs se tiende a expresar por separado los componentes retrovirales encargados de empaquetar el vector y las secuencias que serán transferidas. Aunque en el caso de los RVs se han establecido líneas empaquetadoras que ofrecen buenos títulos, los lentivirus resultan tóxicos para la línea empaquetadora y es necesario co-transfectar *de novo* todos los elementos.

Por otro lado, los transposones recombinantes son herramientas eficientes para conseguir la integración estable de nuestro vector, pero necesitan de medios físicos o químicos accesorios para entrar en la célula diana.

3.2.1.- Producción de vectores virales

Preparación de las células productoras: La producción de SNs virales fue llevada a cabo en las instalaciones dedicadas a tal efecto en el CIEMAT, conforme a las normas de seguridad de estas instalaciones con un nivel de contención biológica 2+. Las células 293T (ATCC-CRL-11268) se sembraron en placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro. Cuando los cultivos alcanzaron el 70% de confluencia se transfectaron empleando el método de precipitación de ADN con cloruro cálcico (CaCl₂).

Transfección mediante complejos de cloruro cálcico:

Para transfectar las células, primero los plásmidos purificados en el punto 3.1.1 se mezclaron con 39,04 µl de CaCl₂ 2,5 M en 0,5 ml de agua destilada. A continuación, sobre la solución de ADN, se añadió gota-a-gota 0,5 ml de HBS 2x pH=7 pre-testado (NaCl 274 mM; HEPES 50 mM; Na₂ HPO₄ 1,5 mM). Es importante mezclar correctamente ambas soluciones. Para facilitar la formación de los precipitados de CaCl₂, se burbujea aire dentro de la mezcla con ayuda de una pipeta. A continuación se añadió 1 ml de la mezcla conteniendo los precipitados de ADN y sales sobre las

placas de 100 mm con las 293T y 8 ml de medio. Las placas fueron devueltas a las estufas a 37°C donde se incubaron durante 8 h. Pasado este tiempo, el medio fue aspirado y sustituido por medio fresco.

Recogida de sobrenadantes infectivos: Tras 24 h de incubación, el SN de los cultivos transfectados se recogió y se repuso para volver a recoger el SN 48 h tras la transfección. Los restos celulares se eliminaron filtrando el medio a través de membranas con un tamaño de poro de 0,45 µm (Millipore). El SN repartido en tubos de 30 ml (Beckman Coulter) fue entonces centrifugado 2 h a 18.000 g en una ultracentrífuga refrigerada a 4°C Avanti J-30I (Beckman Coulter), en un rotor JS-24 (Beckman Coulter). Tras la ultra-centrifugación, se desechó el SN y el sedimento fue resuspendido en 300 µl de PBS estéril. El SN concentrado se repartió en alícuotas de 50-100 µl en tubos de 1,5 ml que fueron almacenadas a -80°C. Se reservó parte del virus para su titulación.

3.2.2.- Titulación de virus recombinantes

Para determinar la concentración de partículas infectivas o TU (del inglés, *transduction units*) en los SNs, estos fueron testados en líneas celulares: HT1080 o 3T3. El día anterior a la titulación, 50.000 células se sembraron en placas multipocillos M24 en medio DMEM suplementado. El día de la titulación, el medio se aspiró y se reemplazó por 200 µl de una serie de diluciones de los SNs. Cuando se testaron vectores concentrados se emplearon las diluciones: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} . Cuando se partía de SNs sin concentrar se testaron las diluciones: $\frac{1}{2}$, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . El mismo día de la transducción se tripsinizó un pocillo para contar el número de células infectadas. Las células se incubaron con el SN toda la noche. La mañana siguiente, el SN fue reemplazado por medio fresco. Entre 7 y 10 días tras la infección las células resuspendidas se contaron con una cámara de Neubauer para proseguir con los siguientes protocolos.

Determinación del título por citometría de flujo: Cuando el vector a titular expresa alguna proteína marcadora fluorescente podemos determinar el título a partir de la fracción de células fluorescentes. Para ello, el día del análisis, resuspendimos las células y las lavamos en PBA. Dejamos el contenido de cada pocillo de titulación en unos 300 µl de PBA (PBS con 0,2% de Azida sódica y 0,1% de BSA) con 2 µg/ml de DAPI y analizamos el porcentaje de células positivas para el fluoróforo correspondiente. Calculamos el número de TUs teniendo en cuenta la fracción de células positivas, el número inicial de células transducidas y la dilución y volumen de SN empleado:

$$\text{Título } [TU \cdot ml^{-1}] = \frac{\text{Células}_{\text{transducidas}} \times \text{Fracción}_{\text{positiva}} \times \text{Dilución}}{\text{Volumen}_{\text{empleado}}}$$

Titulación de los vectores por PCR cuantitativa: Aún en ausencia de genes marcadores es posible calcular el título mediante la amplificación por PCR de secuencias específicas como las LTRs, la señal de encapsidación del lentivirus (Psi), o secuencias específicas del transgén. Es necesario primero homogeneizar y aislar el ADN de cada pocillo por separado. Para ello empleamos un kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Empleamos curvas de dilución de células y de plásmido para extrapolar el número de “copias por célula” (VCN, *vector copy number*) mediante técnicas de PCR que amplifican tanto secuencias específicas del plásmido como secuencias endógenas de las células que sirven de control de carga:

$$\text{Título } [TU \cdot ml^{-1}] = \frac{\text{Células}_{\text{transducidas}} \times \text{Copias}_{\text{por célula}} \times \text{Dilución}}{\text{Volumen}_{\text{empleado}}}$$

3.2.3.- Vectores γ -retrovirales

Empleamos γ -RVs de segunda generación pseudotipados con la proteína fusogénica de la envuelta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). El vector pSF91 LTR_{SFFV} *EGFP wPRE*, referido como *EGFP-RV*, **figura 10**, fue diseñado a partir de la secuencia del retrovirus Moloney de la leucemia de ratón (MMLV) y nos fue cedido por el doctor C. Baum del Instituto de Hematología Experimental, Universidad Médica de Hannover. (Hannover, Alemania).



Figura 10.- Esquema del vector *EGFP-RV* una vez integrado. Junto con la retrotranscripción ARN→ADN_{dh} se da la duplicación de las repeticiones terminales largas (LTR) que tras la integración quedarán en los extremos del vector. SF91_{LTR}, secuencia promotora/enhancer silvestre de la LTR del virus SFFV; R, secuencia repetida de LTR del virus SFFV; U5; secuencia única de la LTR 5'; SD, secuencia donante de *splicing*; ψ , *Psi*: señal de encapsiación; SA, secuencia aceptora de *splicing*; eGFP, ADNc de la proteína verde fluorescente; wPRE, secuencia mejorada de estabilización post-transcripcional del virus WHV.

Los RVs de segunda generación se produjeron y concentraron con el mismo protocolo que se detalla más adelante para los vectores lentivirales.

Tabla 4.-Producción de vectores γ -RV de segunda generación.

Plásmido	bp	ADN μ g/p100 mm
Envuelta (VSV-G)	5.824	5,0 μ g
Empaquetador (<i>gag/pol</i>)	11.160	5,0 μ g
Transferente pSF91 <i>ltrSFFV eGFP wPRE</i>	5.805	15,0 μ g

3.2.4.- Vectores lentivirales

Vector SIN-LV hPGK *FANCA wPRE*^{MUT}: Empleado para evaluar la capacidad terapéutica y la seguridad del LV autoinactivante *FANCA-LV* (SIN-LV hPGK *FANCA wPRE*^{MUT}) diseñado en nuestro laboratorio (Gonzalez-Murillo et al., 2010), **figura 11**. Este diseño ha sido propuesto para su uso en pacientes humanos (Tolar et al., 2011; Tolar et al., 2012).

En los experimentos de optimización se emplearon lotes del vector producidos en células HEK293T mediante la técnica de precipitación de ADN empleando cloruro cálcico. Para la co-transfección de los plásmidos empaquetadores, de la envuelta y transferente empleamos las cantidades reflejadas en la **tabla 5**. Los SNs obtenidos 24 y 48 h tras la transfección fueron concentrados 100 veces en volumen por ultracentrifugación.



Figura 11.- Esquema del vector *FANCA-LV* una vez integrado. Junto con la retrotranscripción ARN→ADN_{dh} se da la duplicación de las repeticiones terminales largas (LTR) que tras la integración quedarán en los extremos del vector. Δ18U3|R|U5, LTR inactivada del virus VIH-1; SD, secuencia donante de *splicing*; ψ , *Psi*: señal de encapsidación; cPPT, tracto central de polipurinas; SA, secuencia aceptora de *splicing*; PGK, promotor de las fosfoglicerato quinasa humana; hFANCA, cDNA del gen humano *FANCA*; wPRE*, secuencia mejorada de estabilización post-transcripcional del virus WHV.

Una vez definidas las condiciones experimentales óptimas, decidimos emplear un lote del vector producido bajo condiciones pre-GMP similar al que se empleará en el ensayo clínico

FANCOLEN-1, producido por el grupo de la doctora Anne Galy, directora de la Unidad INSERM U951. Genethon (Evry, Francia).

Tabla 5.- Producción del SIN-LV hPGK *FANCA* wPRE^{MUT} de tercera generación.

Plásmido	bp	ADN µg/p100 mm
Envuelta HDM-VSV-G	5.824	3,15 µg
Empaquetador (<i>gag/pol</i>)	8.895	5,85 µg
Empaquetador (<i>REV</i>)	4.174	2,25 µg
Transferente pCCL hPGK <i>FANCA</i> wPRE ^{MUT}	11.606	9,00 µg

Vectores SIN-LV STEMCCA: Empleados para reprogramar fibroblastos hacia iPSCs. Son vectores policistronicos que codifican los genes de reprogramación en un solo mensajero bajo el promotor EF1α. Los vectores STEMCCA cMyc y STEMCCA RedLight solo difieren en la sustitución de la secuencia de c-Myc por el marcador fluorescente mCherry, **figura 12**.

Los SNs fueron producidos y concentrados como se ha descrito empleando las cantidades descritas en la **tabla 6**. Los plásmidos de expresión STEMCCA cMyc y STEMCCA RedLight, **figura 12**, así como el plásmido auxiliar HDM-Tat1b, **tabla 6**, fueron obtenidos del doctor Gustavo Mostoslavsky del Centro de Medicina Regenerativa (CREM) de la Universidad de Boston (Boston, EEUU).

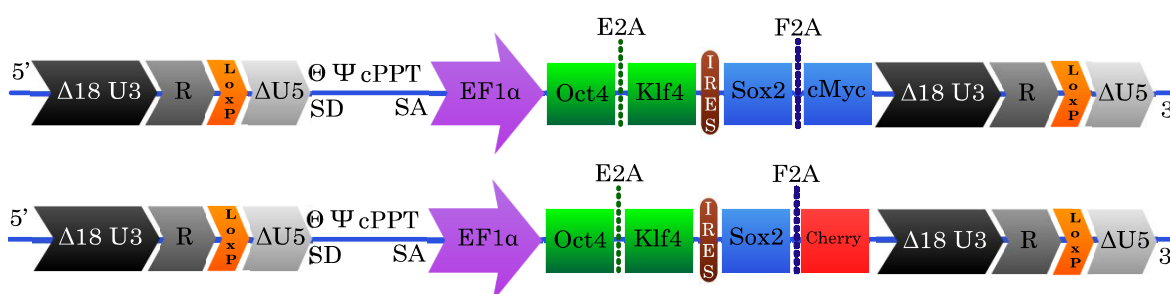


Figura 12.- Esquema de los vectores STEMCCA integrados. Junto con la retrotranscripción ARN-> ADN_{dn} se da la duplicación de las repeticiones terminales largas (LTR) que tras la integración quedarán en los extremos del vector. **Arriba**, STEMCCA cMyc. **Abajo**, STEMCCA RedLight. Δ18U3 | R | LoxP | U5, LTR inactivada del virus VIH-1 incluyendo las señales para la recombinación en presencia de Cre; SD, secuencia donante de *splicing*; Ψ, Psi: señal de encapsidación; cPPT, tracto central de polipurinas; SA, secuencia aceptora de *splicing*; EF1α, promotor ubicuo del factor de elongación-1; wPRE*, secuencia mejorada de estabilización post-transcripcional del virus WHV.

Tabla 6 .- Producción de vectores lentivirales STEMCCA de segunda generación.

Plásmido	bp	ADN µg/p100 mm
Envuelta HDM-VSV-G	6.112	3,0 µg
Empaquetador HDM- <i>Hgptm2</i>	8.910	1,5 µg
Empaquetador HDM- <i>Tat1b</i>	4.829	1,5 µg
Empaquetador HDM-CMV <i>Rev1b</i>	5.900	1,5 µg
Transferente <i>Sin-LV STEMCCA Myc</i>	12.520	15,0 µg
ó		
Transferente <i>Sin-LV STEMCCA RedLight</i>	11.911	

3.3.-VECTORES NO VIRALES

3.3.1.- Transposones

Los transposones son elementos móviles que pueden integrarse y escindirse del genoma que los acoge. A partir de secuencias fósiles del T1c/Mariner se han desarrollado transposones recombinantes *Sleeping Beauty* que pueden funcionar en mamíferos superiores (Ivics et al., 1997). También se ha optimizado la transposasa (SB100X), permitiendo una eficacia de transposición muy alta (Mates et al., 2009).

Se ha empleado un transposón T2/OSKM que codifica un casete reprogramador bajo la dirección del promotor artificial CAG, dentro de las repeticiones directas e invertidas del transposón T2, **figura 13**.

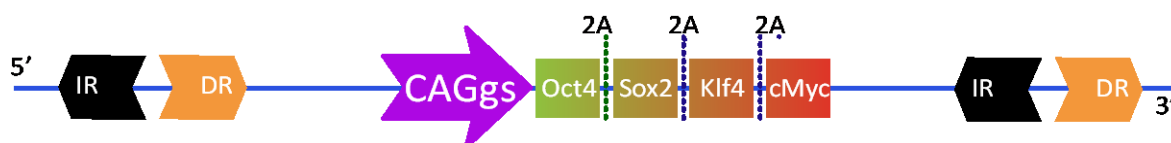


Figura 13.- Esquema del transposón de reprogramación T2/OSKM. El diagrama muestra la configuración del transposón T2/OSKM una vez integrado por la transposasa *Sleeping Beauty* hiperactiva (SB100x). A ambos lados la repetición directa (DR) y la repetición invertida (IR) flanquean el casete de reprogramación. CAGgs, Promotor ubicuo sintético; *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* (*Pouf5*) y *c-Myc* son ADNc de los genes de reprogramación; 2A, son secuencias auto-proteolíticas que separan los factores entre sí.

Los transposones se transfectaron en combinación con la transposasa hiperactiva SB100X. Ambos plásmidos fueron cedidos por el doctor Zoltan Ivics actualmente a cargo de la División de Biotecnología Médica, Paul Ehrlich Institute (PEI) (Langen, Alemania).

4.- MODELO PRECLÍNICO DE TERAPIA GÉNICA EN RATONES *Fanca*^{-/-}

4.1.- GENOTIPADO DE LOS RATONES *Fanca*^{-/-}

Los ratones nacidos del cruce de heterocigotos FVB *Fanca* fueron genotipados rutinariamente a las 2 semanas de vida a partir de una biopsia del ápice caudal. Las “colas” se sometieron a una digestión alcalina durante 1 h a 99°C en 75 µl de la solución *HotShot* (25 mM de NaOH y 0,2 mM de EDTA pH=7), luego fue neutralizada con Tris 40 mM a pH=7,4. De la solución resultante, 0,5 µl se añadieron a una mezcla de PCR Sybergreen 1X (PowerSYBR®Green PCR Master Mix. Applied Biosystems). Siguiendo las instrucciones del fabricante, a la PCR también se le añadieron los cebadores QFneo, QRneo, QF*fanca*4 y QR*fanca*4, **tabla 8**. Las muestras fueron sometidas a 40 ciclos de amplificación en un termociclador ROTOR GENE (Applied Biosystems). Tras la amplificación, las diferentes temperaturas de disociación o *melting* (T_m) de los fragmentos wt (T_m = 84°C) y mutado (T_m = 77°C) fueron analizadas en el mismo termociclador para discernir los distintos productos de PCR de individuos wt, heterocigotos u homocigotos para la mutación en el gen *Fanca*.

4.2.- CORRECCIÓN GENÉTICA Y TRASPLANTE DE PROGENITORES *Fanca*^{-/-}

4.2.1.- Transducción de progenitores lin⁻

Purificación y cultivo *ex vivo* de progenitores lin⁻: Para obtener células de MO para realizar la selección inmunomagnética, sacrificamos ratones machos *Fanca*. La separación magnética se llevó a cabo como se ha detallado (apartado V.1.2.3). Centrifugamos el eluido resultante de lin⁻ y lo

resuspendimos en medio sin suero (StemSpan + 0,5% PenStrep) conteniendo 100 ng/ml de factor de células madre de ratón (mSCF) y 100 ng/ml de interleuquina-11 humana (hIL11) (ambos, de Preprotech) a una concentración de 10^6 células/ml. A continuación las células fueron transducidas.

Transducción de progenitores lin^- : Para la transducción de células hematopoyéticas se emplearon SNs producidos en el laboratorio SIN-LV hPGK-FANCA-wPRE^{MU}. Estos SNs fueron pseudotipados con la envuelta VSV-G y se concentraron para conseguir un stock de 2×10^8 TU/ml producidos en condiciones pre-GMP por la empresa Genethon (París, Francia).

Para una infección típica, con una MOI=20, 0,5 ml de células (a 1×10^7 células lin^- /ml) se mezclaron con 0,5 ml de SN SIN-LV PGK FANCA wPRE^{MUT} (con un título de 2×10^8 TU/ml). A la suspensión se le añadió protamina sulfato (SIGMA) a una concentración final de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La mezcla se depositó en placas M6 tratadas para cultivos celulares (Falcon) que previamente habían sido tapizadas a 4°C con 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de Retronectina® (Takara). La infección se dejó toda la noche (16 h) en un incubador a 37°C.

Como control genotóxico se empleó el γ -RV SF91 GFP wPRE^{MUT}, pseudotipado con la envuelta VSV-G. La infección con el vector γ -RV se realizó sobre lin^- pre-estimuladas durante un periodo de 48 h porque los vectores γ -RV infectan células cuando estas están ciclando activamente. Las células se sometieron a 2 ciclos de infección concatenados de 8 y 16 h. Debido a que los títulos obtenidos eran menores, para equiparar la MOI se realizaron precargas centrifugando 0,5 – 1,0 ml de SN a 1.400 g durante 1 h 30 min a 4°C sobre placas con retronectina. Sobre las placas precargadas se añadió la mezcla del γ -RV con las células y se dejó incubar igual que LVs.

Como control negativo de la infección (*mock*), un grupo de células lin^- se sometió a condiciones de cultivo y transducción idénticas al grupo problema sustituyendo el SN infectivo por un volumen igual de PBS.

Una vez finalizada la transducción, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS y fueron contadas. Luego, fueron resuspendidas para su inoculación y también sembradas en medios de cultivo líquido y semisólido.

4.2.2.- Trasplante de progenitores modificados genéticamente

Acondicionamiento de ratonas receptoras *Fanca*^{-/-}: A menos que se indique lo contrario, los ratones receptores fueron hembras *Fanca*^{-/-}. Se emplearon hembras de entre 12 y 16 semanas, preferiblemente de la misma camada. Las ratonas fueron sometidas a dosis mieloablativas de irradiación para facilitar el injerto de progenitores hematopoyéticos. Las ratonas fueron acondicionadas mediante 2 dosis de 5 Gy, pautadas a día -1 y día 0 del trasplante. En estas condiciones las hembras no trasplantadas fallecen en una ventana de 2-3 semanas debido al fallo de la MO.

Trasplante de progenitores lin^- : El día del trasplante, una vez finalizada la transferencia genética, contamos las células transducidas o células sin modificar y se prepara una suspensión en medio PBS sin suero a 10^7 células/ml. Como se ha detallado (apartado V.1.2.3), de esta solución se inyectaron 200 μl en la vena lateral de la cola de cada receptor empleando agujas de 25 G.

Trasplante seriado de MO: Para hacer estudios a más largo plazo, las MOs regeneradas a partir de los inóculos inyectados fueron trasplantadas nuevamente en receptoras *Fanca*^{-/-} acondicionadas con el mismo régimen de irradiación. A tal fin, 6 meses después del trasplante se extrajo la MO de las ratonas primarias. En esta ocasión, un total de 10^7 células de MO fueron inyectadas ratón-en-ratón para poder hacer seguimiento de la cinética clonal. En determinados

experimentos juntamos las suspensiones de las MOs de varios ratones en una misma mezcla, con una aportación idéntica de cada receptor primario. Cada receptora recibió 200 μ l de la mezcla, conteniendo 10^7 células, inyectadas en la vena lateral de la cola.

4.3.- EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL VECTOR SIN-LV PGK *FANCA wPRE^{MUT}*

4.3.1.- Seguimiento periódico de los ratones *Fanca^{-/-}*

A partir de su trasplante, mantuvimos una vigilancia rutinaria para advertir posibles efectos adversos de la terapia en las receptoras *Fanca^{-/-}*. La tesis más extrema era que la terapia podría resultar en leucemia por lo que visitamos frecuentemente las ratonas en busca de anomalías en el comportamiento, coloración o postura que pudieran sugerir alguna enfermedad. Realizamos sangrados a 1 y 3 meses para estudiar la reconstitución de la hematopoyesis y la presencia del vector. Pasados 6 meses desde el trasplante, procedimos al análisis a término que incluyó sangre, MO y otros órganos hematopoyéticos.

Análisis sanguíneos: En la recuperación de los linajes sanguíneos, los linfocitos son el linaje que más tiempo tarda en normalizarse tras un trasplante de MO en ratón, este proceso termina a los 34 días (Forsberg et al., 2006).

Las sangres conteniendo un 5%-10% de anticoagulante fueron introducidas en un contador hematológico Abacus Junior Vet. Este análisis emplea 5-10 μ l (apartado V.1.2.1). La muestra restante se sometió a una lisis eritrocitaria para posteriores análisis de citometría y extracción de ADN. Se analizaron las sangres de los ratones 1, 3 y 6 meses tras la infusión de las células modificadas genéticamente.

Definimos los rangos de normalidad en $4-12 \times 10^6$ leucocitos/ml. Se realizaron también extensiones de 3 μ l de sangre en portaobjetos de vidrio sin tratar que fueron fijadas sumergiéndolas 10 min en metanol.

Tabla 7.- Anticuerpos usados para el análisis de sangres por citometría de flujo.

Epítipo	Alias	Presente en	Fluoróforo*	Compañía	Clon
CD3 ϵ	CD3	TCR, linfocitos T	FitC	BD Pharmingen	145-2C11
			PE	BD Pharmingen	145-2C11
CD45.R/B220	B220	BCR, linfocitos B	PE	BD Pharmingen	RA3-6B2
Ly6-G	Gr-1	Gr-1, monocitos	FitC	BD Pharmingen	RB6-8C5
CD11b	CD11b	Mac-1, macrofagos y monocitos	FitC	BioLegend	M1/70
			PE	BD Pharmingen	M1/70
Ly5 A-E (Sca 1)	Sca-1	Sca-1, CMH y linfocitos pro-B	PE	BD Pharmingen	E13-161.7
CD117	C-kit	C-kit, CMH	PE	BD Pharmingen	2B8
CD4	CD4	CD4, linfocitos T auxiliares	FitC	BD Pharmingen	H129.19
CD8a	CD8	CD8, linfocitos T citotóxicos	PE	BD Pharmingen	53-6.7

*FitC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina.

Análisis por citometría de la reconstitución de los linajes hematopoyéticos: Diluimos las muestras de sangre en 20 volúmenes de solución de lisis fresca (0,155 mM de NH_4Cl ; 0,01 mM de KHCO_3 y 10^{-4} mM de EDTA). Seguidamente, las mezclas se incubaron durante 15 min a TA en oscuridad. A continuación, se lavó la solución de lisis centrifugando las muestras a 456 g durante

10 min en un rotor TY.JS0 en un equipo Beckman J-GM/E Centrifuge (Beckman). Resuspendimos las sangres lisadas en 50 µl de PBA por tubo de marcaje.

Sobre los tubos se añadieron los anticuerpos primarios para detectar linfocitos T (CD3⁺), linfocitos B (B220⁺), macrófagos (Ly6 G⁺), granulocitos (Ly6 G⁺, CD11b⁺) así como células más primitivas (C-kit⁺, Sca1⁺), **tabla 7**. Tras incubar los anticuerpos durante 30 min a 4° en oscuridad, lavamos las células empleando 2 ml de solución de lisis y las centrifugamos a 456 g durante 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en 300-400 µl de PBA con 2 µg/ml de DAPI como colorante vital.

Evaluación del número de copias y quimerismo en sangre periférica: Partiendo del ADN genómico aislado de los sedimentos de sangre una vez lisada, el ADN fue extraído empleando el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen).

Tabla 8: Oligonucleótidos y sondas para el análisis por PCR y qPCR.

Amplificación	bp	Oligo/Sonda	Fluoróforo*	Secuencia 5' → 3'
HIV-LTR	142	MH531		TGTGTGCCCGTCTGTTGTGT
		MH532		GAGTCCTGCGTCGAGAGAGC
		LTR-Probe	6-FAM	CAGTGGCGCCCGAACAGGGA
Transgén Neo		QFneo		ACCTTGCTCCTGCCGAGAA
		QRneo		GATCAAGCGTATGCAGCCG
Fanca endógeno (wt)	76	QFfanca4		CGCAGTGTGCAGCAGGTCT
		QRfanca4		GGCCGGCTTCTCACACTTT
		FANCA_F		GCTCAAGGGTCAGGGCAAC
Transgén FANCA	95	FANCA-R		TGTGAGAAGCTCTTTTCGGG
		FANCA-Probe	6-FAM	CGTCTTTTCTGCTGCAGTTAATACCTCGGT
		F_Sry		TGTTCAGCCCTACAGCCACA
Cromosoma Y	140	R_Sry		CCTCTCACCACGGGACCAC
		P_Sry	6-FAM	ACAATTGTCTAGAGAGCATGGAGGGCCA
B-Actina	131	BAct-F		ACGGCCAGGTCACTACTATTG
		BAct-R		ACTATGGCCTCAGGAGTTTGTCA
		PmBDNA	Tx-Red	AACGAGCGGTTCCGATGCCCT
GFP	84	FeGFP		GTAACGGCCACAAGTTCAGC
		ReGFP		TGGTGCAGATGAACTTCAGGG
		PeGFP	6-FAM	CTTGCCGTAGGTGGC
Titina	123	TitinMex5.F		AAAACGAGCAGTGACGTGAGC
		TitinMex5.R		TTCAGTCATGCTGCTAGCGC
		TitinMex5.P	Tx-Red	TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC
Psi (ψ)	130	Psi.F		CAGGACTCGGCTTGCTGAAG
		Psi.R		TCCCCGCTTAATACTGACG
		Psi.P	6-FAM	CGCACGGCAAGAGGCGAGG

*Fluoróforos: 6-FAM, 6 carboxi fluoresceína; Tx RED, Texas red.

Se añadieron 4 µl del ADN eluido sobre una mezcla de PCR Taqman (Universal PCR Master Mix. Roche) con cebadores y sonda específicos según el caso. Se emplearon los cebadores para ψ (*Psi*) y Titina para determinar el número de copias, **tabla 8**.

Las muestras fueron amplificadas en un termociclador de PCR a tiempo real Rotor Gene. Para poder extrapolar el número de copias empleamos una curva de un plásmido que incluye la señal lentiviral *Psi* y el gen Titina. Para determinar el porcentaje de quimerismo, empleamos una sonda y cebadores para las secuencias específicas del cromosoma masculino de ratón (*SrY*) y otros específicos contra el gen de la β Actina de ratón (*BAct*), **tabla 8**. Para extrapolar los valores se incluyeron varios puntos de una curva de ADN genómico de células de MO de ratones macho, extraída en las mismas condiciones que nuestras muestras.

4.3.2.- Análisis a término

La MO de los receptores primarios y secundarios a término, 6 meses tras haber recibido el trasplante de células modificadas, fue extraída y procesada. Además de determinar el número de copias con el mismo protocolo que se ha detallado para leucocitos de sangre periférica, en estas muestras evaluamos la actividad biológica del vector y parámetros predictivos de genotoxicidad como su patrón de integraciones.

Recuento de unidades formadoras de colonias y actividad biológica del SIN-LV PGK FANCA *wPRE^{MUT}*: Establecimos cultivos clonogénicos en metilcelulosa como se explica en el punto V.2.1. De esta manera, pudimos valorar el contenido basal de los progenitores hematopoyéticos para formar colonias CFU-GM sembrando 1.000 células lin⁻ o 10.000 células de MO total.

La sensibilidad frente a agentes entrecruzantes del ADN, como la mitomicina (MMC), es una cualidad diagnóstica que comparten las células de pacientes humanos (Jacome et al., 2009; Gonzalez-Murillo et al., 2010) y del ratón *Fanca*^{-/-} (Cheng et al., 2000; Rio et al., 2002). Para comprobar la eficacia del vector SIN-LV PGK FANCA *wPRE^{MUT}*, se añadieron cantidades crecientes de MMC sobre cultivos de 1 ml de metilcelulosa mezclada con 3.000 células lin⁻ o 30.000 células procedentes de la MO total de los ratones trasplantados. Un día después de haber sembrado las células, añadimos sobre las placas 50 µl de diluciones crecientes de MMC (Mitomicin C from *Streptomyces caespitosus*. SIGMA) hasta alcanzar una concentración final de 10, 30, 50 y 100 nM. Las células se mantuvieron una semana en las estufas con una temperatura constante de 37°C y una concentración de CO₂ del 5%. El número de colonias CFU-GM fue determinado 7 días después de su siembra.

4.3.3.- Estudios complementarios

La legislación actual no admite la posibilidad de que la terapia génica afecte a la línea germinal. Por esto es importante conocer la biodistribución de las células modificadas así como tener la certeza de que el vector una vez integrado permanecerá inerte, en el sentido de no poder formar nuevas partículas infectivas.

Biodistribución del vector: En el momento del sacrificio de los ratones secundarios se tomaron muestras de diversos órganos hematopoyéticos (SP, MO, bazo y timo) y no hematopoyéticos (hígado, riñones, piel, músculo, cerebro y gónadas) para comprobar la presencia de vectores integrados mediante técnicas de PCR. Los tejidos de varios ratones fueron homogeneizados para aislar el ADN utilizando un kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Para determinar el número de copias de vector se emplearon los mismos reactivos y condiciones descritos (apartado V.4.3.1.).

Detección de partículas lentivirales competentes replicativas (RCLs): La presencia de RCLs puede demostrarse en los ratones receptores por la presencia de la proteína p24 del virus VIH, que forma parte de la cápsida del vector. Se empleó un kit comercial de ELISA (HIV P-24 ELISA. Perkin Elmer) para testar los sueros de los ratones trasplantados. Se extrajo el suero a los 6 meses del trasplante a partir de 1 ml de sangre de los ratones receptores. Siguiendo las instrucciones del kit, se sometieron los sueros junto con controles positivos y negativos a una disrupción de los complejos inmunes mediante una incubación con detergente (Tritón X-100 y Glicina). Neutralizadas las muestras se capturaron en placas multipocillos del kit, recubiertos de anticuerpos de captura. Se incubaron los anticuerpos de detección y la peroxidasa y tras lavar las muestras se reveló el ELISA. Los datos colorimétricos fueron registrados en un espectrofotómetro (GENios PRO. Tecan) y analizados conforme a las instrucciones del kit.

4.3.4.-Estudio del patrón de integración de *FANCA*-LV

Una de las herramientas mejor consideradas para predecir la aparición de clones dominantes o pre-leucémicos en pacientes tratados con terapia génica es el análisis de los sitios de integración (IS). En estos se amplifican las secuencias de ADN genómico colindantes con cada vector integrado empleando una PCR mediada por una amplificación lineal (LAM-PCR) (Schmidt et al., 2001; Schmidt et al., 2002). Posteriormente, para su identificación recurrimos a la tecnología de secuenciación masiva. Para ello, antes tuvimos que añadir oligos identificadores a los ADNs amplificados. Por último, las integraciones fueron analizadas por métodos bioinformáticos.

LAM-PCR: Para poder estudiar el perfil de integración primero tuvimos que extraer el ADN de las sangres y la MO, como se ha explicado anteriormente. Empleamos 500 ng de ADN de cada muestra de partida: MO o sangre a 1, 3 y 6 meses. Sometimos las muestras a una primera amplificación lineal (50 ciclos) a partir de unos oligos específicos y previamente biotinilados, para la región terminal 5' del provirus integrado, **tabla 9**.

Tabla 9: Oligonucleótidos empleados para el estudio de IS por LAM-PCR.

Paso	Nombre	Secuencia (5'→3')	Observación	*Mod.
0.-Casete conector	LC1	GACCCGGGAGATCTGAATTCAGTGGCACAGCAGTTAGG		
	LC3	AATTCCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATC	Tsp509I	
	LC3'	ATCCTAACTGCTGTGCCACTGAATTCAGATC	MseI	
1-PCR lineal	SK-LTR 1 Bio	GAGCTCTCTGGCTAACTAGG		5'-[Bio]
	SK-LTR 3 Bio	AGCTTGCCCTTGAGTGCTTCA	LV	5'-[Bio]
	LTR SFFV Bio	AGTGCTCAAGTAGTGTGTGCC	RV	
2-Purificación	Dynal-Beads		Magnéticas	
3-ADN_{dh}	Hexanucleotidos	NNNNNN		
4-Digestión	Tsp509I		65°C	
	MseI		37°C	
5-Ligación	LK1	LC1 +LC3	Tsp509I	
	LK2	LC1 + LC3'	MseI	
6- Exponencial 1	LCI	GACCCGGGAGATCTGAATTC		
	Ltr II SFFVBio	GACCTTGATCTGAACTTCTC	RV	5'-[Bio]
	SK Ltr 4 Bio	AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT	LV	5'-[Bio]
7.- Purificación	Dynal-Beads		Magnéticas	
8.-Exponencial 2	LC II	GATCTGAATTCAGTGGCACAG		
	LTR III	TCCATGCCTTGCAAAATGGCG	RV	
	SK-LTR 4	AGTAGTGTGTGCCCGTCTGT	LV	

*Mod., modificaciones; 5'-[Bio], secuencia covalentemente unida a biotina en su extremo 5'.

El producto de la amplificación se incubó durante una noche con partículas ferromagnéticas recubiertas de estreptavidina y se sometió a una captura magnética. Después, se realizó una PCR con hexanucleótidos inespecíficos sobre la muestra purificada, para obtener ADN de doble cadena. Para generar fragmentos manejables para los siguientes pasos, las muestras se digirieron con enzimas de restricción que reconocen secuencias de cuatro nucleótidos en el vector, que son frecuentes en el genoma. Empleamos las enzimas Tsp509I y MseI que dejan tras de sí extremos protuberantes 3': AATT y AT, respectivamente. Sobre estos extremos ligamos un casete para la amplificación exponencial anidada de los fragmentos amplificados (*nested PCR*). Una vez ligado el casete, empleamos cebadores biotinilados para amplificar y purificar el ADN entre la LTR y el casete de amplificación. Por último, volvimos a someter las muestras purificadas a una PCR anidada.

Para comprobar que la técnica había tenido éxito, la suspensión de ADN conteniendo las integraciones amplificadas se resolvió en geles de TBE con agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Empleamos también geles comerciales Spreadex (Elchrom Scientific) para comparar los patrones oligo o policlonales de las distintas muestras. Estos geles se han empleado para evidenciar algunos comportamientos clonales, pero debido al gran número de integraciones que se detectan en nuestros experimentos, resulta más fiable recurrir a la secuenciación masiva.

Mega PCR y secuenciación masiva de integraciones: Empleamos una PCR para fusionar nuestras secuencias de la LAM-PCR con los oligos de identificación y amplificación necesarios para la secuenciación masiva. Estos oligonucleótidos son ADNs lineales, un extremo del cebador reconoce la LTR o el casete mientras que el resto sobresale. La pareja de oligonucleótidos contiene un “*Megalinker*” común a todas las muestras de células modificadas con LVs o γ -RV y un “*Megaprimer*” que incluye una secuencia específica identificatoria (*barcode*) de 10 nt. Con estos oligonucleótidos podríamos marcar hasta 4¹⁰ muestras y secuenciarlas simultáneamente.

Partimos de 20 ng del producto de la LAM-PCR de cada muestra y los mezclamos con su *Megalinker* y su *Megaprimer* para someterlos a 12 ciclos de amplificación en los que los oligonucleótidos quedan perfectamente fundidos con las secuencias problema. Este producto de PCR fue de nuevo purificado y resuelto en geles de agarosa al 2% para comprobar su integridad antes de ser enviado a la empresa GATC (GATC-Biotech AC. Konstanz, Alemania), donde fue sometido a secuenciación en un pirosecuenciador Roche 454.

La secuenciación masiva o *pirosecuenciación* permite la secuenciación conjunta de muchas muestras, ahorrando tiempo y reactivos.

Análisis bioinformático de las integraciones: Para estos análisis contamos con la colaboración del laboratorio del doctor Manfred Schmidt. Los análisis a partir de las secuencias crudas se llevaron a cabo en el Centro Alemán de Investigación del Cáncer (DKFZ, Heidelberg, Alemania). Para ello, se emplearon programas propios, desarrollados en el laboratorio del Dr. M. Schmidt, funcionando en el entorno de red Galaxy (<http://galaxyproject.org/>) instalado en equipos de dicho centro. Básicamente, el trabajo del programa consistió en listar las secuencias que tenían unos estándares de calidad y un tamaño suficiente. Posteriormente, se seleccionaron sólo aquellas lecturas que estaban acorde con el esquema esperado: LTR, *Megaprimer*, una secuencia variable desconocida, casete de amplificación y *Megalinker*. Las secuencias que superan esta criba con éxito son incluidas en una base de datos de integraciones como “lecturas” (o “*reads*”, en inglés). Estas fueron identificadas según sus secuencias identificativas (*barcode*) y alineadas en el genoma de ratón (mm10, Genome Reference Consortium GRCm38). Como resultado el programa devolvió una base de datos de integraciones separadas según su origen en el que tenía en cuenta el número de lecturas de cada una de ellas. Estas bases de datos fueron almacenadas como hojas de cálculo Excel (Microsoft Office 2010).

5.- GENERACIÓN DE iPSCs DEFICIENTES EN DNA-PKcs

5.1.- CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS Scid

5.1.1.- Genotipado de células obtenidas de ratones Scid

Los ratones BALB/c control y homocigotos para la mutación *Prkdc*^{scid} se cruzaron para obtener camadas homogéneas homocigotas control, heterocigotas y homocigotas para la mutación. Se aisló ADN de los cultivos primarios de MEFs establecidos de embriones E13.5 empleando el

DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Como la mutación Scid genera una nueva diana para Alu I en el exón 85 del gen *Prkdc*, amplificamos el *locus* mediante una PCR con oligonucleótidos específicos para las secuencias colindantes, **tabla 10**.

Tabla 10: Cebadores para la determinación del genotipo y número de copias en ADN_g.

Amplicón	bp	Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'
HIV-LTR	142	MH531	TGTGTGCCCCGTCTGTTGTGT
		MH532	GAGTCCTGCGTCGAGAGAGC
Locus Scid	78	oIMR0803	GGAAAAGAATTGGTATCCAC
		oIMR0804	AGTTATAACAGCTGGGTTGGC
IR/DR en 5'	139	T2Onc2left	CAGTTGAAGTCGGAAGTTTA
		IRDLR2	GACTTGTGTCATGCACAAAGTAGATGTCC
B-Actina	131	BAct-F	ACGGCCAGGTCATCACTATTG
		BAct-R	ACTATGGCCTCAGGAGTTTGTCA

Empleamos 4 µl de cada muestra junto con los cebadores y 10 µl de una mezcla de PCR 2X TaqMan (Universal PCR Master Mix. Roche). Seguidamente sometimos el producto de PCR a una digestión diagnóstica para genotipar los fibroblastos: del producto de la PCR, 4 µl fueron digeridos con Alu I (New England Biolabs). Los fragmentos digeridos y 4 µl del producto de PCR sin digerir se resolvieron en un gel de agarosa al 3% en TBE (solución compuesta por 0,45 mM de Tris, 0,45 mM de ácido bórico, 10 mM de EDTA a pH=8), aplicando un voltaje constante de 100 V. También empleamos la misma aproximación para genotipar iPSCs generadas a partir de estos fibroblastos.

5.1.2.- Caracterización funcional de cultivos Scid

La deficiencia en DNA-PKcs confiere a las células un fenotipo diferencial. Las células Scid expuestas a IR son muy radiosensibles (Biedermann et al., 1991). Además su incapacidad para reparar las DSB permite ver una señal mantenida de γ-H2AX (Pankotai et al., 2012). Otra característica distintiva de la ausencia de DNA-PKcs es la alteración del normal mantenimiento del extremo terminal de los telómeros, o “*caping*” (Goytisolo et al., 2001).

Supervivencia de unidades formadoras de colonias de fibroblastos: Los MEFs wt y Scid fueron irradiados a pase 2. Una vez tripsinizados los cultivos, los resuspendimos a una densidad de 10⁵ células/ml en medio DMEM sin suero que repartimos en varios tubos. Las suspensiones fueron irradiadas en instalaciones propias del CIEMAT con un equipo de rayos-X MG324 (Philips), irradiando a una tasa 1,07 Gy/min. Los tubos recibieron 0, 1, 2 ó 3 Gy. Acto seguido, lavamos las células en medio DMEM suplementado y sembramos 20.000 y 100.000 células en placas de 100 mm previamente tratadas con 8 ml de una solución al 0,1% de gelatina estéril. Entre 7 y 10 días después de la siembra, sobre la superficie de las placas pudimos observar unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F). Para contar el número de colonias en cada placa, las células se fijaron 10 min con metanol y a continuación se lavaron e incubaron 2 min con cristal violeta (2,5 µg/ml). El tinte se lavó repetidas veces y el número de CFU-Fs se determinó bajo la lupa.

Supervivencia de células madre pluripotentes inducidas: Las iPSCs fueron amplificadas en dos pases sucesivos en ausencia de estroma de soporte sobre placas pre-tratadas con gelatina en medio condicionado. Se sembraron 20.000 ó 100.000 iPSCs sobre gelatina el día anterior a la irradiación en placas M12 ó M6, respectivamente. El mismo día de la irradiación, se sustituyó el medio por medio mES sin suero y las placas fueron expuestas a dosis de 0, 2 ó 3 Gy. Después, se añadió medio mES completo y dejamos que las células se recuperaran 30 min en medio completo. A continuación, las células se levantaron con tripsina (0,05%) y se contaron para sembrarlas sobre

estromas de soporte en placas M6 donde pudieran generar de nuevo colonias de iPSCs. Entre 7 y 10 días después de la irradiación, cuando las colonias de iPSC tenían un tamaño adecuado, las placas se fijaron con PFA al 4% (Proanalysis Formaldehyde Solution min 37%, 10% methanol. Merck) durante 2 min y las placas se tiñeron empleando un kit comercial (Alkaline Phosphatase Detection Kit, Millipore). Las colonias AP positivas con una morfología característica de ES/iPS se contaron bajo el microscopio invertido (40x).

Longitud telomérica: La longitud de los telómeros se puede determinar a partir de la hibridación con sondas fluorescentes específicas *in situ* (FISH). Partimos de un lisado celular enriquecido en metafases mediante la incubación de las células con colchicina (KaryoMAX colcemid, Gibco) antes de la fijación y extensión sobre un portaobjetos. Las muestras fueron fijadas en PBS con formaldehído al 4% durante 2 min. Los portaobjetos fijados fueron sumergidos 5 min en PBS en tres lavados sucesivos, digeridos 10 min en una solución de 0,2% (w/v) de pepsina (Pepsin from porcine gastric mucosa, SIGMA), con 0,063% de ácido clorhídrico (HCl). Después, las muestras se lavaron con PBS y se fijaron con una solución de PFA al 4% y se lavaron 3 veces antes de deshidratarlas en soluciones crecientes de etanol al 70%, 90% y 100%. A continuación, las preparaciones se dejaron secar al aire entre 5 y 20 min. Luego se añadieron las sondas específicas contra el centrómero (FITC, Eurogentec) y el telómero (Cy3-PNA- (CCCTAA)₄) y las muestras se desnaturalizaron incubándolas 3 min a 80°C. Tras permitir que las muestras renaturalizaran durante 2 h a TA, se lavaron con T-PBS (PBS con 0,1% de Tween20) y se volvieron a deshidratar como antes. Una vez secas, las muestras se montaron con Moviol/DAPI (Dako) y se fotografiaron en un microscopio de fluorescencia a 200x. Las imágenes capturadas fueron estudiadas empleando el software TFL-TELO.

5.2.- Uso de vectores lentivirales de reprogramación celular

La reprogramación celular es una técnica novedosa que se sirve de la expresión ectópica de factores de transcripción de ESCs en células adultas (Takahashi and Yamanaka, 2006). En los experimentos de “prueba de concepto” se empleó la co-transducción de varios vectores. En la actualidad existen herramientas optimizadas que mejoran la eficacia del proceso.

5.2.1.- Vectores SIN-LV escindibles para la generación de iPSCs

El profesor Gustavo Mostoslavsky del Centro de Medicina Regenerativa (CReM) de la *Boston University* (Boston, Estados Unidos), nos cedió amablemente los vectores *STEMCCA cMyc* y *STEMCCA RedLight* para reprogramar células adultas (Sommer et al., 2010). Estos son vectores SIN-LV de segunda generación que incorporan señales LoxP en los extremos de las LTR. Estas secuencias LoxP son reconocidas y conjugadas por la enzima recombinasa CRE. De esta manera suministrando la CRE en *trans* es posible escindir el contenido del vector que pasa a formar un episoma circular que se va a perder o eliminar (Sommer et al., 2010).

Producción de vectores SIN-LV para la generación de iPSC: La producción de vectores de reprogramación SIN-LV se llevó mediante precipitación con cloruro cálcico como se ha detallado.

Los lotes producidos, una vez concentrados, fueron testados en la línea de fibroblastos humanos HT1080, por citometría de flujo en el caso del SIN-LV *STEMCCA RedLight* o por qPCR en el caso del SIN-LV *STEMCCA Myc*. Los lotes empleados rindieron títulos por encima de 10^7 TU/ ml.

Protocolo de transducción: Para reprogramar MEFs adaptamos los protocolos desarrollados en el laboratorio de Gustavo Mostoslavsky (Sommer et al., 2009). En un volumen final de 500 µl, se transdujeron 1×10^5 MEFs a pase 2 en pocillos de M6 (MULTIWELL™ 6 well. FALCON) con los

vectores SIN-LV STEMCCA Myc o STEMCCA RedLight pseudotipados con la envuelta VSV-G. El medio DMEM se suplementó con 8 ng/ml de protamina sulfato (SIGMA). Además de emplear una relación vector/célula alta, con MOIs cercanas a 100, se emplearon volúmenes pequeños, menores a 0,5 ml de volumen final, para aumentar la concentración de virus y células, y así favorecer la interacción entre ambos. Tras 8 h de incubación se añadió medio pMEF completo hasta 2 ml y las placas se mantuvieron en la estufa toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente, el medio con restos de SN fue aspirado y reemplazado por medio fresco. El tercer o cuarto día desde la infección, antes de que los cultivos llegaran a confluencia, estos se pasaron sobre una nueva placa, a razón de 1×10^5 células por pocillo con 2 ml de medio mES.

5.2.2.- Escisión del vector de LV-iPSC

Se partió de líneas LV-iPSC, morfológicamente similares a ESCs que presentaban: propagación en colonias de borde suave, SSEA-1 en superficie y un ciclo celular desplazado. Realizamos un análisis por citometría para seleccionar clones sin el bloqueo G2-M que no hubiesen adquirido aneuploidías. El clon elegido fue amplificado en ausencia del estroma de soporte.

Para inducir la expresión de la recombinasa CRE, se empleó un LV no integrativo *EGFP SFFV CRE* (IDLV-CRE) con un título de 3×10^8 TU/ml desarrollado en el laboratorio de C. Baum (Maetzig et al., 2010). Los plásmidos para producir estos vectores fueron cedidos por el Dr. T. Maetzig y la Dra. M. Galla del laboratorio del Prof. C. Baum de la Escuela Médica de Hannover, Alemania.

Se mezclaron 2×10^4 células iPSC generadas con el vector STEMCCA RedLight con 15 µl del SN del vector IDLV-CRE ($4,5 \times 10^6$ TU, MOI≈200) en 150 µl de medio mES condicionado y se sembraron en placas M24 tapizadas con gelatina. Tras 8 h de incubación a 37°C se añadió medio mES condicionado. Las células se resuspendieron 3 días después de la transducción: la mitad fue sembrada directamente en una placa de 100 mm provista de una monocapa de fibroblastos de soporte, la otra mitad se volvió a infectar con 10 µl del vector IDLV CRE y también fue sembrada sobre un estroma de soporte. Tras una semana creciendo sobre los estromas irradiados, emergieron colonias fluorescentes (mCherry) y otras que habían perdido la fluorescencia. Aislamos las colonias que no eran fluorescentes y las amplificamos.

Southern blot: Se digirieron entre 5 y 10 µg de ADN genómico con las enzimas PstI o EcoRV (ambas de New England Biolabs) y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. El resultado se transfirió a membranas de *nylon* (Hybond-N+ Amersham Biosciences) en una solución de NaOH 0,4 M que se hibridó toda la noche con las sondas indicadas, IRES o wPRE, marcadas con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP usando el kit de marcaje Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech) y obtenida de fragmentos de digestión del plásmido STEMCCA cMyc con las enzimas PstI o EcoRV. Los filtros hibridados se lavaron 2 veces en tampón SSC 2x (0,03 M citrato sódico, 0,3 M NaCl) a TA. Posteriormente, se sometieron a 2 lavados en SSC 2x + SDS 0,2% (v/v) a 65°C durante 20 min, seguidos de un lavado a TA con SSC 2x. Para la detección de la sonda marcada y unida al ADN fijado en la membrana se usó el sistema Phosphorimaging (Bio-Rad Molecular Imager FX).

5.3.- ESTRATEGIAS NO VIRALES DE REPROGRAMACIÓN CELULAR

Es posible emplear aproximaciones no virales para forzar la expresión ectópica de los factores de transcripción que se emplean para reprogramar células somáticas (Okita et al., 2008; Yusa et al., 2009; Zhou et al., 2009; Muenthaisong et al., 2012).

5.3.1.- Transposones para la generación de iPSC

Los transposones como el *Sleeping Beauty* (SB) en combinación con transposasas hiperactivas son herramientas no virales con eficacias de transferencia muy alta. El plásmido T2/OSKM contiene un transposón de reprogramación diseñado en el laboratorio del doctor Zoltan Ivics en el Centro de Biología Celular Max Delbrück en Berlin, Alemania. El transposón incorpora un promotor artificial CAGgs que fue construido fusionando la secuencia *promotor/enhancer* del citomegalovirus (CMV-I/E) en 3' con el promotor de la Beta-actina del pollo (Ac) previamente modificado (AG) (Niwa et al., 1991). El resultado es un promotor potente y ubicuo capaz de liderar la expresión de genes en cualquier tejido y estadio de diferenciación (Okabe et al., 1997). Tras el promotor encontramos un gen policistrónico artificial (OSKM) que expresa un ARNm que incluye los factores Oct3/4 (Pouf 5) y Sox2 unidos por una secuencia 2A. Este hecho hace que todos los factores alcancen los mismos niveles de expresión, al menos teóricamente. Cerrando el diseño hay otro tándem IR/DR que es necesario para la formación de la estructura pre-integracional.

Protocolo de transfección: Para introducir los transposones en las células empleamos un tipo especial de transfección llamado nucleofección, patentado por AMAXA. Para cada nucleofección se partió de 2×10^6 MEFs a pase 2. Siguiendo las instrucciones del fabricante, las células fueron sometidas al programa T20 en un equipo de nucleofección (*Nucleofector 1*. Amaxa). Se utilizó un ratio 1/10 entre el plásmido que codifica la transposasa SB100X y el transposon T2/CAGgs OSKM. Por cubeta, añadimos 4,2 µg del plásmido T2/CAGgs OKSM junto con 0,42 µg del plásmido SB100X, en la solución del kit MEF2 (Amaxa® MEF2 Nucleofector® Kit. Lonza). Una vez finalizado el programa de electroporación, los fibroblastos fueron resuspendidos en medio pMEF y se cultivaron normalmente en placas de 100 mm de diámetro pre-tratadas con 8 ml de una solución de gelatina al 0,1%, filtrada por 0,1 µm. Al día siguiente y 4 días después, se evaluó la viabilidad de las células electroporadas y se pudieron analizar los primeros parámetros de citometría de flujo gracias a la disponibilidad de material. A los 4 días, aspiramos el medio de las células y lo sustituimos por medio mES completo. Siete días después de la nucleofección las células se sembraron sobre estromas de soporte irradiados para evaluar la formación de colonias con morfología ES/iPS.

5.4.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES

A pesar de que la contribución a la formación de quimeras es la evidencia absoluta de la pluripotencia propia o adquirida, existen muchas otras características informativas que se cumplen en células ES e iPS.

5.4.1.- Selección de colonias de células reprogramadas

Entre 6 y 7 días tras la transfección/transducción las células fueron sembradas sobre cultivos de soporte. Para aislar colonias iPSC, se sembraron 3×10^5 células procedentes de la transfección/transducción en placas *petri* de 100 mm de diámetro para cultivos celulares (Corning), tapizadas previamente con células de soporte irradiadas. Por otro lado, para determinar la eficacia de reprogramación, se sembraron dos concentraciones de 3×10^4 y 3×10^5 células en placas multipocillo M6 sobre los estromas de soporte. A partir del décimo día tras la infección, los cultivos fueron evaluados a diario. Así se consiguió seguir la aparición de colonias compactas de bordes redondeados y morfología ESC. Habitualmente, a partir del día 15, las colonias fueron evidentes y tuvieron un tamaño suficiente para ser “picadas” individualmente mediante una digestión suave de la placa con tripsina 0,05% y aspirado de las colonias individuales en 50 µl de volumen con la ayuda de un microscopio invertido. Una vez aisladas, las

colonias se disgregaron en placas multipocillo M96 (Microtest™ 96. FALCON) y se sembraron en 0,5 ml de medio mES en pocillos de placas multipocillos M24 (Corning), previamente provistas de una monocapa de fibroblastos de soporte irradiados. Los clones se amplificaron empleando los mismos protocolos que se ha explicado para las líneas embrionarias.

5.4.2.- Citometría de flujo

Determinación de proteínas fluorescentes: En los experimentos con el vector SIN-LV STEMCCA mCherry, la detección de proteína roja fluorescente resultó de gran ayuda para evaluar la fracción de células correctamente transducidas. Las células se resuspendieron en tubos de citometría en 300 µl de PBA conteniendo DAPI (2 µg/ml) a modo de colorante vital. La fluorescencia de la mCherry fue registrada en el canal rojo ($\lambda = 610 \pm 20\text{nm}$) excitando la proteína con un láser amarillo (Yellow/Green $\lambda = 562\text{ nm}$) en un citómetro BD LSR Fortessa (Beckton Dickinson).

Marcadores de superficie: Las colonias fueron resuspendidas en 50 µl de PBA por marcaje. Sobre este volumen añadimos el anticuerpo SSEA1-PE, **tabla 11**, y se dejó incubar la mezcla durante 1 h en nevera, a 4°C en oscuridad. Las células marcadas se lavaron añadiendo 2 ml de PBA por tubo y se centrifugaron durante 7 min a 1.400 rpm. Finalmente, las células fueron resuspendidas en 300 µl de PBA conteniendo 2 µg/ml de DAPI en tubos de citometría y acto seguido fueron analizadas en el citómetro de flujo BD LSR Fortessa.

Tabla 11: Anticuerpos empleados.

Epítipo	Alias	Presente en	Fluoróforo*	Compañía	Clon
SSEA-1	CD-15	Superficie de células ES	FitC	BD	
			PE	R&D	MC-480
OCT3/4	POU5F1	Citoplasma de células ES	FitC	R&D	240408
NANOG		Núcleo de células ES	PE	BD	M55-312
Anexin V		Superficie de células apoptóticas			
γ-H2AX		Focos de ADN dañado			

*Fluoróforos: FitC, isotiocianato de fluoresceína; PE, ficoeritrina

Ciclo celular: Se analizó el ciclo celular de ESC/iPSCs, cultivos de fibroblastos transducidos y controles. Las células ESC/iPSCs fueron previamente expandidas durante varios pases sobre gelatina, en ausencia del estroma de soporte. Antes de ser fijadas, las células fueron tripsinizadas. Después, las células se lavaron en PBS, dejando entre 10^5 y 10^6 células resuspendidas en 0,5 ml de PBS. A continuación se fijaron durante 15 min en hielo añadiendo 4,5 ml de formaldehído al 1% (v/v). Seguidamente se centrifugaron a 1.400 rpm (456 g) durante 7 min, se lavaron en PBS y finalmente se resuspendieron en 2 ml de etanol al 70%. Esta última mezcla fue almacenada a -20°C al menos 24 h y no más de 2 semanas antes de proceder a su análisis por citometría de flujo.

El día del análisis, las células se permeabilizaron en BSA-T-PBS y luego las resuspendimos en 300 µl de PBA con 2 µg/ml de DAPI para analizarlas en el citómetro de flujo BD LSR Fortessa.

5.4.3.- Inmunohistoquímica

El estudio sobre colonias de ESC/iPSCs fijadas manteniendo su morfología y estructura original también es importante para la caracterización de estas células.

Para los ensayos inmunohistoquímicos, las células se cultivaron sobre estromas de soporte irradiados con recambio diario de medio mES durante al menos 5 días para permitir que las

colonias alcanzaran un tamaño suficiente. Las células se crecieron en placas multipocillos M6 o sobre portaobjetos multi-cámara (4 chamber polystyrene culture slides, BD Falcon). Fijamos las colonias a TA en una solución de PFA al 4%. Tras eliminar los restos de PFA con lavados en PBS, las células fueron almacenadas a 4°C en oscuridad hasta su tinción.

Fosfatasa alcalina: Para la determinación de colonias ESC e iPSC positivas para la expresión de fosfatasa alcalina (AP), se cultivaron colonias de ESC/iPSC en placas multipocillo M6 sobre un estroma de soporte irradiado. Se fijaron durante 2 min con una solución de PFA al 4% y después se lavaron varias veces empleando TBS-T (20 mM de Tris HCl a pH=7,8; 140 mM de NaCl y Tween-20 al 0,1%). Siguiendo las instrucciones del kit (Alkaline Phosphatase Detection Kit. Chemicon), tras aspirar el último lavado, se incubó cada pocillo con 1 ml de una mezcla de agua, naftol y *fastred*[®], los dos últimos suministrados en el kit. Las colonias con morfología ESC positivas para la AP fueron analizadas empleando un microscopio invertido (OLYMPUS 1X70). Las placas fueron fotografiadas con una cámara (LEICA IM50) utilizando un objetivo de aumento 40x.

Factores de transcripción y marcadores de superficie: Las preparaciones fijadas fueron previamente atemperadas y lavadas 3 veces en PBS. Las células fueron permeabilizadas durante 15 min en una solución de BSA-T-PBS conteniendo tritón X-100 al 0,2%. Se lavaron los restos de tritón y se bloqueó durante 30 min en la solución de bloqueo: BSA-T-PBS. A continuación, el bloqueo fue sustituido por los anticuerpos diluidos en BSA-T-PBS. Rutinariamente, se ensayaron anticuerpos contra SSEA-1, Nanog y Oct3/4, **tabla 11**. Tras incubar los anticuerpos toda la noche a 4°C en oscuridad, las muestras se lavaron con BSA-T-PBS y los portaobjetos fueron entonces montados empleando una mezcla Moviol + DAPI. Las colonias fueron estudiadas a 200x aumentos en un microscopio de fluorescencia (ApoTome. Zeiss).

5.4.4.- Estudios genéticos

PCR para la determinación de copias de los vectores: El ADN genómico se extrajo de cultivos creciendo en ausencia de estromas.

Para determinar el número de provirus integrados en los clones de LV-iPSCs, se utilizó un juego de cebadores que hibridan en las LTRs del VIH-1 (Butler et al., 2001), **tabla 10**. El número de copias para cada muestra de ADN se extrapoló empleando una curva de dilución del plásmido STEMCCA. El número de células se determinó a partir de la concentración de ADN, asumiendo que el genoma de una célula diploide de ratón contiene 660 pg de ADN (Gregory, 2012). Para validar nuestros datos se empleó ADN genómico de un ratón transgénico que contiene 10 copias de un LV integradas por célula y comprobadas por *Southern*, material cedido por el laboratorio del Dr. L. Naldini, San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (TIGET) en Milán, Italia.

La determinación del número de copias del transposón en los clones de Tn-iPSCs se llevó a cabo de manera análoga empleando oligonucleótidos contra secuencias del IR/DR del extremo izquierdo (3'), **tabla 10**. Para determinar el número de copias en el ADN purificado se extrapoló una curva de diluciones seriadas del plásmido T2/CAGgs OSKM. Para relativizarlo al número de células, medimos la cantidad de ADN genómico en un espectrofotómetro (ND1000. Nanodrop). Validamos nuestro método empleando ADN genómico extraído de clones de iPSC con 1 y 2 copias del transposón integradas, cedidos por el laboratorio del Dr. Zoltan Ivics, División de Tecnología Médica, Paul Ehrlich Institute (PEI) en Langen, Alemania.

En la elaboración de las curvas de plásmido, los plásmidos purificados a 1 µg/µl se diluyeron en función de su tamaño asumiendo como peso medio por base (bp) 650 Da, hasta llegar a una solución de $2,5 \times 10^6$ moléculas/µl. A partir de esta dilución “madre” se realizaron diluciones

seriadas 1:10 para componer los puntos de la curva.

Expresión de genes de pluripotencia: Las células se crecieron en ausencia de estromas de soporte durante 2 pases. Las ESC/iPSCs creciendo sobre gelatina en pocillos M6 fueron centrifugadas en tubos de 1,5 ml y el RNA total fue extraído con el kit RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) y finalmente eluido en 50 µl.

Partiendo de 10 µl de ARN de cada muestra, se preparó una PCR de síntesis del ADN copia (ADNc) en 30 µl empleando los reactivos y protocolos del kit comercial: RETROscript® First Strand Synthesis Kit (AMBIION). Básicamente, éste emplea la transcriptasa inversa del retrovirus MMLV. Se utilizó una batería de deca-nucleótidos inespecíficos (*random decamers*) a modo de cebadores para asegurarse la amplificación de todo el ARN presente en la muestra. Posteriormente, se empleó una dilución 1/10 de este ADNc para los siguientes experimentos.

El ADNc fue sustrato de PCRs cuantitativas para determinar los niveles de expresión de genes de pluripotencia como *Klf-4*, *Oct3/4*, *Nanog*, *Utf-1*, *Sox2* y *mGAPDH* como control de carga. Los cebadores empleados se listan en la **tabla 12**.

Tabla 12: Oligonucleótidos empleados en los estudios de pluripotencia.

Amplicón	Tamaño (bp)	Cebadores	Secuencia 5'→3'
<i>Klf 4</i>	109	Klf4 F	AACATGCCCGGACTTACAAA
		Klf4 R	TTCAAGGGAATCCTGGTCTTC
<i>Oct 3/4</i>	160	Oct4 F	TAGGTGAGCCGTCTTCCAC
		Oct4 R	GCTTAGCCAGGTTTCGAGGAT
<i>Nanog</i>	106	Nanog F	TTGCTTACAAGGGTCTGCTACT
		Nanog R	ACTGGTAGAAGAATCAGGGCT
<i>Sox 2</i>	70	Sox2 F	GAAACGACAGCTGCGGAAA
		Sox2 R	TCTAGTCGGCATCACGGTTT
<i>Utf 1</i>	104	Utf1 F	ACGTGGAGCATCTACGAGGT
		Utf1 R	TAGACTGGGGGTCGTTTCTG
<i>Gapdh</i>	108	mGAPDH F	TCCAAGGAGTAAGAAACCCTGGA
		mGAPDH R	GAAATTGTGAGGGAGATGCTCAG

Cada muestra se analizó por duplicado. En cada reacción de 20 µl se añadieron: 4 µl de la muestra, 10 µl de la solución de PCR Sybergreen 2x (*PowerSYBR®Green PCR Master Mix*, Applied Biosystems), los cebadores y agua MiliQ. Las PCRs fueron programadas y leídas en un termociclador RG-3000 (Rotor Gene, Corbett Research). Empleando diluciones de ADNc de la línea mES J1 se pudo calcular la eficiencia de amplificación de cada pareja de cebadores. Los niveles de expresión relativa se calcularon empleando la línea embrionaria mES J1 como referencia, teniendo en cuenta las eficiencias de amplificación y las diferencias en el “Ct” (ciclo en que se alcanza el umbral de amplificación).

5.4.5.- Estudios de metilación de promotores

Partiendo de ADN genómico de ESC/iPSCs amplificadas en ausencia de estromas de soporte, se trató el ADN con el reactivo bisulfito que induce cambios Citosina → Uracilo, pero no reacciona con las metilcitosinas. Luego se amplificaron por PCR las regiones promotoras de *Nanog* y *Oct4* usando como molde los productos purificados de la reacción con el bisulfito y se secuenciaron. Para determinar el grado de apertura de los promotores, se apilaron secuenciaciones independientes. Las citosinas conservadas en la secuencia se consideraron como metilcitosinas y las transiciones a timina como citosinas sin metilar.

5.4.6.- Inducción de teratomas

Tras la contribución a la generación de embriones, la capacidad de formar teratomas es una clara evidencia de que una iPSC es capaz de diferenciarse en cualquier tejido con independencia de la capa germinativa de la que proceda (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Las ESC/iPSCs se amplificaron sobre placas tratadas con gelatina 0,1% (EIA Grade Reagent, gelatina. BIO-RAD) en ausencia de cocultivo de soporte (ver apartado V.2.2.3). El día de la inoculación las células se resuspendieron, se contaron en la cámara *Neubauer* y se centrifugaron (10 min, 335 g, TA). Un total de 10^6 células ESC o iPSC resuspendidas en PBS estéril, a una concentración de 5×10^6 células/ml, fueron inyectadas sub-epidérmicamente en el flanco de ratones NSG. Cada ratón fue inoculado con 200 μ l de la suspensión celular empleando jeringuillas estériles desechables provistas de agujas de 25 G. Los ratones NSG así inoculados, fueron examinados semanalmente para evaluar la aparición de bultos sospechosos en el flanco inyectado. Cuando las masas fueron evidentes (entre 5 y 8 semanas), los animales se sometieron a eutanasia y posterior autopsia. Los teratomas fueron enviados a un laboratorio externo de anatomía patológica que determinó su identidad histológica: ANAPATH (Anapath Diagnóstico Anatomo-Patológico Veterinario; www.anapath.es).

5.5.- CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EN REPROGRAMACIÓN

5.5.1.- Capacidad de propagación *in vitro*

Antes y durante la reprogramación, se realizó un seguimiento de los MEFs. Las células se tripsinizaron y se contaron diluidas en el colorante *trypan blue* en una cámara *Neubauer* para estimar el número total de células y la fracción de células muertas. Los recuentos se llevaron a cabo en los tiempos indicados.

5.5.2.- Susceptibilidad a la manipulación genética de células Scid

Para poder descartar problemas en la transducción de células Scid, se recurrió al vector SIN-LV STEMCCA RedLight y se estudiaron células transducidas a distintas MOI, mediante el seguimiento de la fracción de células positivas mediante citometría de flujo. Se examinaron los MEFs transducidos a tiempos cortos (3 días) para poder ver la capacidad del vector para reconocer y penetrar en los MEFs. También se evaluó mCherry en MEFs tras un tiempo suficiente de aclaración (7 días), para poder analizar diferencias en la capacidad de integración en células wt y Scid.

5.5.3.- Ensayos de senescencia

Para realizar la tinción β -galactosidasa a pH subóptimo asociada a senescencia (SA- β -Gal), se sembraron 2×10^4 MEFs en pocillos M6 pretratados con gelatina y se transdujeron con los vectores STEMCCA. Los cultivos tratados y los controles sin transducir se mantuvieron en cultivo 10 días antes de ser fijados en formaldehído al 2% durante 15 min. Los restos de formaldehído se lavaron con PBS y entonces las placas se tiñeron a pH=6 con el Senescent β -galactisidase Staining Kit (Cell Signaling). La reacción se detuvo lavando las placas con PBS y las células azules fueron entonces contadas en un microscopio invertido empleando un aumento de 200x.

5.5.4.- Expresión de proteínas de senescencia y envejecimiento celular

La acumulación y aumento de la expresión de algunas proteínas como TP53 y P21/CIP1 se

asocia con una respuesta de la célula frente a diversos tipos de daño y otros marcadores como P16/INK^{4a} con senescencia celular. Para poder sacar el máximo rendimiento a las muestras, sometimos las células a un protocolo de extracción con TRIzol® (Invitrogen) que nos permitió recuperar las proteínas y el ARN simultáneamente.

PCR de expresión: A partir del ARN total se sintetizó el ADNc como se ha explicado anteriormente.

Empleamos una dilución 1:10 de los ADNc para amplificar por PCR los transcritos de *Tp53*, *P21/Cip1/Waf1*, *P15/Ink^{4b}*, *P16/Ink^{4a}*, *Pcna* y *c-Myc*. Para ello se diseñaron cebadores específicos con ayuda del software ProbeFinder (versión 2.47. Roche). Para la amplificación por PCR, se emplearon los oligonucleótidos de la **tabla 13**.

Tabla 13.- Cebadores para el estudio de la expresión de genes de senescencia y proliferación.

Amplificación	bp	Oligo	Secuencia 5' → 3'
<i>Pcna</i>	114	PCNA_L	CTAGCCATGGGCGTGAAC
		PCNA_R	GAATACTAGTGCTAAGGTGTCTGCAT
<i>tp53</i>	74	tp53_L	ATGCCCATGCTACAGAGGAG
		tp53_R	AGACTGGCCCTTCTTGGTCT
<i>p21/CIP1</i>	62	p21_L	AACATCTCAGGGCCGAAA
		p21_R	TGCGCTTGGAGTGATAGAAA
<i>p16/INK^{4a}</i>	96	p16_L	TGGGTAGAGCCACCCTTCT
		p16_R	AAAAGGAAAAAGCAAAGACGAA
<i>p15/INK^{4b}</i>	64	p15_L	AATAACTTCCTACGAATTTTCTGC
		p15_R	CCCTTGGCTTCAAGGTGAG
<i>c-Myc</i>	114	RTmMyc F	TAACTCGAGGAGGAGCTGGA
		RTmMyc R	GCCAAGTTGTGAGGTTAGG

Los cálculos se hicieron a partir de duplicados técnicos. En cada reacción se añadieron 10 µl de la mezcla de PCR Sybergreen 2X, 4 µl de la muestra y el resto de reactivos hasta un volumen de 20 µl, acorde con las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron amplificadas y leídas en un termociclador RG-3000 (Rotor Gene. Corbett Research). A partir de diluciones seriadas del ADNc de fibroblastos control, se determinaron las eficiencias de amplificación de las distintas parejas de cebadores y calculamos las variaciones de expresión en función de estas y de las diferencias en el Ct (ciclo en que se alcanza el umbral de amplificación). Como control de carga se empleó el gen *Gadph* de ratón. Los niveles de expresión relativa se calcularon empleando las células wt sin tratar como normalizador.

6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los datos en las gráficas se presentan como media aritmética ± el error estándar. La significación de las diferencias entre distintos grupos fue determinada empleando la prueba *T-student*. El procesamiento y los análisis estadísticos de los datos fueron realizados usando el programa informático *Statgraphics Plus* (Manugistics Inc.).

VI.- RESULTS

1.- ANALYSIS OF THE SAFETY AND EFFICIENCY OF A LENTIVIRAL VECTOR FOR THE GENE THERAPY OF FA-A PATIENTS

Gene therapy protocols capable of efficiently restore the *FANCA* gene in hematopoietic stem cells (HSC) would be of utmost benefit for a high proportion of FA patients since more than 60% of them harbor mutations affecting the *FANCA* gene. However, prior to step into clinical settings, safety and efficacy tests are needed. *In vivo* studies constitute one of the best approaches to cope with the long time-span needed to analyze the effects induced because of the retroviral integration in HSCs. Thus, herein, we have investigated the use of a therapeutic *FANCA*-LV in a mouse model of FA-A.

1.1.- SHORT *EX VIVO* TRANSDUCTION WITH *FANCA*-LV CORRECTS THE PHENOTYPE OF MOUSE *Fanca*^{-/-} HEMATOPOIETIC PROGENITORS WITH MINIMAL TOXICITY

Given the high stress levels suffered by FA cells during *in vitro* cultures, we have set a short (16-20 h) single-shot transduction protocol to minimize the manipulation of FA HSCs, similar to what has been devised for an upcoming clinical trial for Fanconi patients (FANCOLEN-1: EudraCT: 2011-006100-12). Just after immunomagnetic lineage depletion of bone marrow (BM) cells, these samples were incubated overnight with VSV-G pseudotyped *FANCA*-LVs. Next day, cells were washed and resuspended in media for either *in vitro* or *in vivo* analyses, **figure 14**.

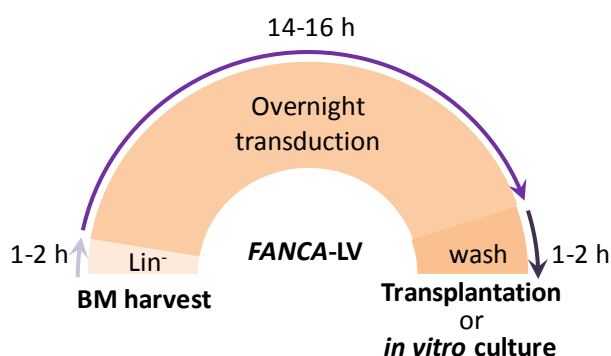


Figure 14.- *FANCA*-LV gene therapy protocol with minimal *ex vivo* manipulation. BM cells from *Fanca*^{-/-} male mice were subjected to immunomagnetic depletion of mature cells and then incubated overnight with the *FANCA*-LV supernatant (SN). Next day, the cells were washed and used for either *in vitro* assays or transplanted into conditioned *Fanca*^{-/-} female recipients.

For optimization of gene therapy protocols based on the transduction and transplant of *lin*⁻ from a FA strain: FVB *Fanca*^{ΔE4-E7:LacZ-NEO} (henceforward called *Fanca*^{-/-}), we used VSV-G pseudotyped vectors produced and concentrated in-house, **table 14**. The sequences of the vectors, SIN-LV PGK *FANCA* *wPRE** (*FANCA*-LV) (Gonzalez-Murillo et al., 2010) and control γ-RV SFFV *eGFP* *wPRE** (*EGFP*-RV) (Modlich et al., 2006), tested herein are described in *Materials and Methods* (section V.3.2.3 and V.3.2.4). Transient co-transfection of HEK293T was used to ensemble the vector particles. VSV-G packaged LVs were harvested and concentrated 100 fold in volume by ultracentrifugation. Titers of concentrated batches were determined in HT1080 cells by flow cytometry or qPCR analyses one week after transduction.

Once all cell manipulations were optimized, the same experimental settings were applied to a batch of *FANCA*-LV from Genethon (Evry, France), produced under pre-GMP conditions. Titers

from the batches assayed are shown in **table 14**.

Table 14.- Experimental batches and transductions summary

Vector	Exp.	Titer (TU/ml)	Envelope	MOI	Cell dose	%lin ⁻	Recipients
FANCA-LV (CIEMAT/CIBERER)	Optim.L1	1.0x10 ⁸	VSV-G	~10	360,000	88%	5
	Optim.L2	2.0x10 ⁸	VSV-G	~2	300,000	99%	10
	Optim.L3	3.0x10 ⁹	VSV-G	120	400,000	94%	6
	Optim.L4	3.0x10 ⁹	VSV-G	133	300,000	75%	4
	L1	3.0x10 ⁹	VSV-G	133	400,000	94%	4
Pre-GMP FANCA-LV (Genethon)	L2	2.0x10 ⁸	VSV-G	50	400,000	85%	10
	L3	2.0x10 ⁸	VSV-G	20	500,000	60%	10
	L4	2.0x10 ⁸	VSV-G	20	300,000	80%	10
	L5	2.0x10 ⁸	VSV-G	20	500,000	72%	10
EGFP-RV (CIEMAT/CIBERER)	Optim.R1	9.0x10 ⁵	Eco	~10	400,000	88%	5
	Optim.R2	9.0x10 ⁵	Eco	~3	500,000	98%	10
	Optim.R3	1.0x10 ⁶	VSV-G	~3	400,000	94%	4
	R1	1.7x10 ⁷	VSV-G	~20	340,000	80%	10

Summary of the experiments undertaken for the optimization of *Fanca*^{-/-} HSC transduction with FANCA-LV and EGFP-RV. The MOI in the case of EGFP-RV is the result of several infection cycles. All primary recipients were *Fanca*^{-/-} female except in *Optim.L2* where wt female were used. Exp., experiment; MOI, multiplicity of infection; VSV-G, vesicular stomatitis virus G glycoprotein; Eco, ecotropic envelope; TU, transduction units.

As shown in **table 14**, the LVs produced in house or by Genethon had similar good titers, which allowed us to transduce lin⁻ *Fanca*^{-/-} BM cells at MOIs of 20 and above.

Primary BM lin⁻ cells were obtained from young adult (10-14 weeks old) *Fanca*^{-/-} male mice. The marrow cell suspensions were processed for lin⁻ purification in a QuadroMACS magnetic separator. Purity of lineage depleted cells was evaluated by flow cytometry, see **table 14**. The average purity was always above 70% of lin⁻ cells. Following purification, *Fanca*^{-/-} lin⁻ were mock transduced or incubated with the therapeutic LV.

After overnight transduction on Retronectin® coated plates, cells were washed and split for either *in vitro* or *in vivo* analyses, **figure 14**. For transduction experiments with RVs, cells were cultured with cytokines to allow 48 h pre-stimulation prior to genetic modification. As shown in **figure 15**, we scored a similar numbers of colony forming cells (CFCs) in transduced wt or *Fanca*^{-/-}, regardless of the MOI.

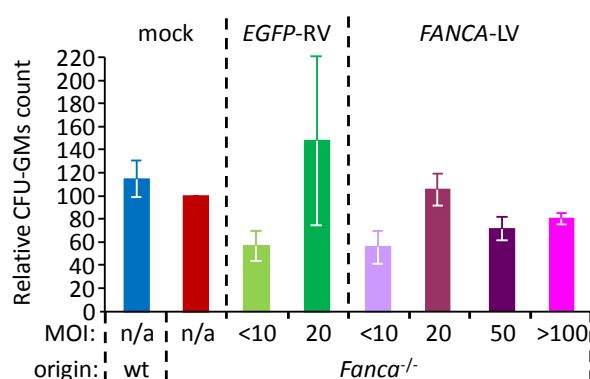


Figure 15. Transduction impact on the CFU-GMs viability. Lin⁻ BM cells from *Fanca*^{-/-} donors were subjected to transduction using the different MOIs of either FANCA-LV or EGFP-RV. CFU-GM scores are relative to mock *Fanca*^{-/-} lin⁻ BM cell cultures set in each experiment, mean and standard errors are shown.

Mitomycin C (MMC) sensitivity of CFCs was evaluated after transduction with FANCA-LV or with EGFP-RV. FANCA-LV transduced cells evidenced normalization of FA hypersensitivity at all

tested doses, as reflected by the number of CFCs scored after 7 days in culture in presence of MMC, **figure 16**.

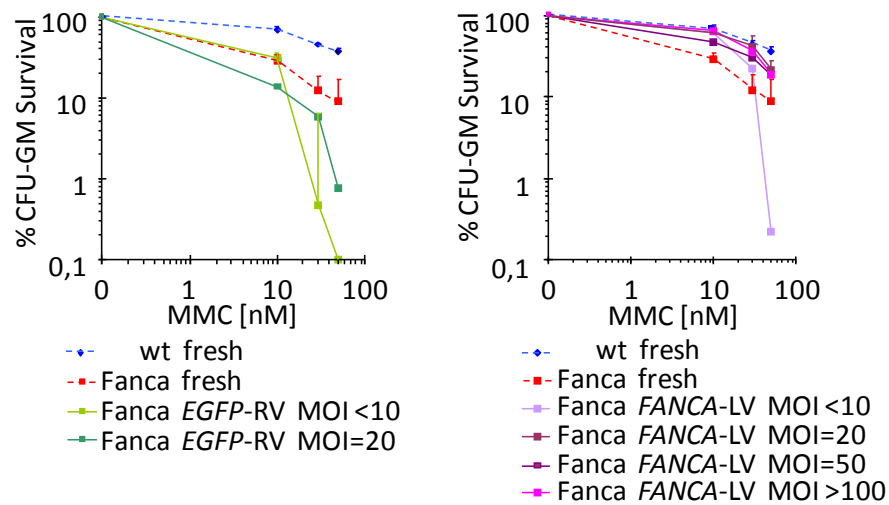


Figure 16. Effect of *FANCA*-LV or *EGFP*-RV transduction on the sensitivity of *Fanca*^{-/-} CFU-GMs to mitomycin C. Cells transduced with either *EGFP*-RV or *FANCA*-LV were plated on methylcellulose plates and challenged with increasing doses of MMC. Panels show the CFU-GM survival curves for either *EGFP*-RV (**left**) or *FANCA*-LV (**right**).

The differential generation of hematopoietic colonies in semisolid media containing MMC is consistent with previous reports of *in vitro* correction of human samples by *FANCA*-LV (Gonzalez-Murillo et al., 2010).

These results show that we were able to obtain good quality vector batches with high titers, either produced in house or under pre-GMP conditions for the preclinical testing of *FANCA*-LV correction. Using a short *ex vivo* transduction protocol, we managed to transduce *Fanca*^{-/-} lin⁻ BM cells with minimal cell loss due to manipulation or toxicity. Besides, moderate MOIs of *FANCA*-LV efficiently corrected the FA phenotype of hematopoietic progenitors from *Fanca*^{-/-} mice.

1.2.- *FANCA*-LV PRESERVES LONG TERM REPOPULATING ABILITY OF PHENOTYPICALLY CORRECTED HEMATOPOIETIC STEM CELLS WITH LOW TOXICITY

For *in vivo* studies, 4-5x10⁵ transduced *Fanca*^{-/-} lin⁻ BM cells were infused into irradiated (5 + 5 Gy) *Fanca*^{-/-} female recipients. From the day of the transplant, recipients were routinely explored for external signs of illness. Visual follow up was complemented with peripheral blood (PB) analyses performed at 1, 3 and 6 months after transplantation. After such a long-term follow up, 10⁷ total BM cells from primary recipients were serially transplanted into secondary *Fanca*^{-/-} females also subjected to IR conditioning.

1.2.1.- *FANCA*-LV corrected cells contribute to hematopoietic recovery of *Fanca*^{-/-} recipients

Irradiation syndrome after myeloablative irradiation may cause death in a narrow window around 20 days after exposure to IR. The transplant of gene-modified lin⁻ BM cells protected most of the primary recipients from the lethal irradiation syndrome, **figure 17**. This was also true for secondary recipients receiving 10⁷ BM cells from primary recipients in the *FANCA*-LV cohort. In some cases, HSCs aged during the long-term engraftment in primary recipients did not rescue secondary recipients from the lethal effects of the myeloablative radiation regimen, **figure 17**.

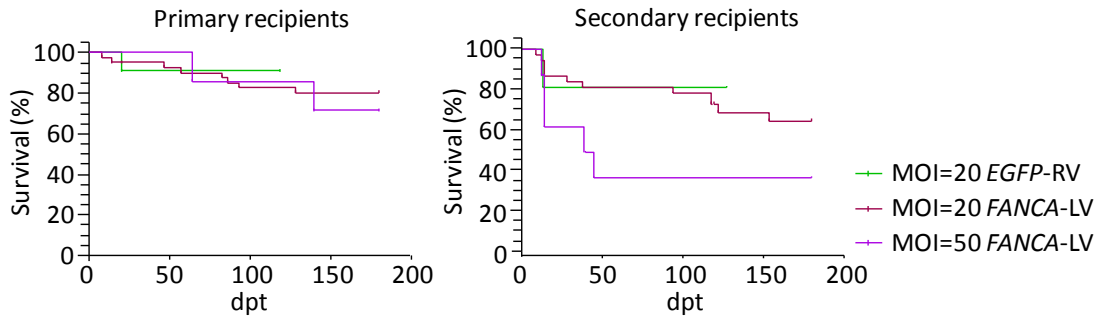


Figure 17.- Kaplan-Meiers surviving charts of mice corresponding to FANCA-LV and EGFP-RV cohorts. Both primary (left) and secondary (right) recipients survival curves are plotted. Survival curves are interrupted at end-point analyses when full characterization of the hematopoietic tissues was conducted. dpt, days post transplantation.

The functionality of the engrafted HSCs, giving rise to circulating mature blood cells, was documented by detection of donor Y-chromosome sequences in PB over time, **figure 18**. Furthermore, persistence of gene-corrected HSC in the BM could be confirmed in total marrow samples taken at end-point analysis. The contribution of donor cells to the recipients' hematopoiesis was determined using qPCR on genomic DNA isolated from blood and marrow samples.

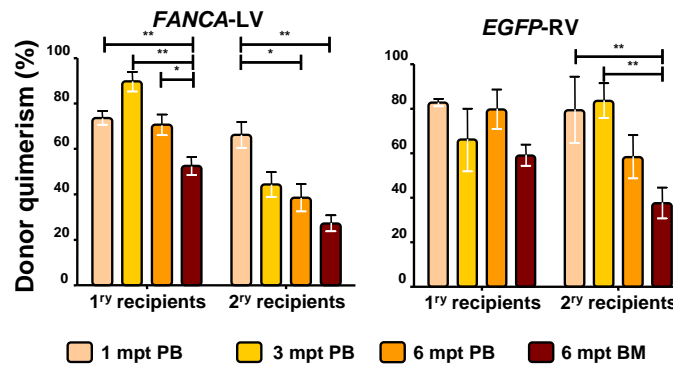


Figure 18.- Contribution of male-donor cells in PB and BM samples from primary and secondary recipients. DNA was isolated from PB sampled at 1, 3 and 6 months post-transplant and BM at end-analysis. Subsequently, donor chimerism was determined by qPCR through specific amplification of Y-chromosome and mGADPH on the samples from FANCA-LV (left) and EGFP-RV (right) cohorts. Bars and whiskers represent mean and standard errors, respectively. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, T-test.

In general, good engraftment levels close to 80% were observed in primary recipients. The initial engraftments determined in secondary recipients were also high, although a progressive decrease of chimerism was observed in all animals, **figure 18**.

Besides, hematological counts reflected essentially normal values of red blood cells (RBC) and white blood cell (WBC) from first month analyses. The different blood populations identified by the cell counter resemble more variation in cell numbers and distribution of lymphocytes and granulocytes in the animals reconstituted from RV-modified HSC while a healthy steady hematopoiesis over time was documented in the FANCA-LV cohorts, either primary or secondary recipients, **figure 19**.

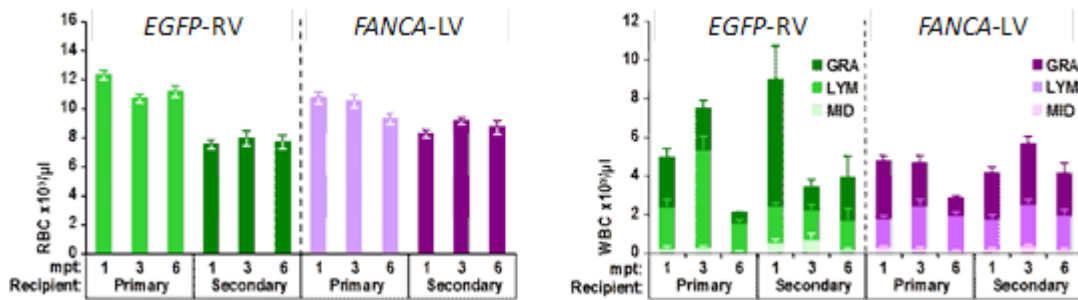


Figure 19.- Hematological counts from *FANCA-LV* and *EGFP-RV* recipients after gene therapy. Blood samples harvested at 1, 3 and 6 months after cell infusion of *FANCA-LV* and *EGFP-RV* treated cells. **(Left chart)** RBC followed from 1 mpt onwards in primary and secondary recipients. **(Right chart)** Leukocyte counts in PB from 1 mpt onwards in primary and secondary recipients. RBC, red blood cells; WBC, white blood cells; mpt, months post-transplant; GRA, granulocytes and monocytes; LYM, lymphoid cells; MID, medium and intermediate sized circulating cells. Bars and whiskers represent mean and standard errors, respectively.

1.2.2.- Absence of adverse effects of *FANCA-LV* transduced *Fanca*^{-/-} HSCs after serial transplantation

We evaluated the basal content of hematopoietic progenitors in total BM samples from transplanted mice to know whether the vector integration could have induced any improvement (due to the *FANCA* complementation) or on the contrary any deleterious effect (due to vector-associated toxicity) on the compartment of hematopoietic progenitor cells. We found that CFCs present in BM from adult *Fanca*^{-/-} animals were significantly decreased with respect to same age wt controls. The correction of these cells with the *FANCA-LV* significantly increased progenitors' content to normal values, **figure 20**.

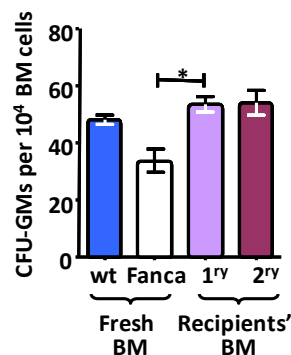


Figure 20- Content in hematopoietic progenitors in *Fanca*^{-/-} recipients treated by gene therapy. Equal numbers of total BM cells from fresh *Fanca*^{-/-} mice (white bar), fresh wt control mice (blue bar) or *FANCA-LV* recipients, either primary (lilac bar) or secondary (purple bar), were seeded into methylcellulose plates to assess CFU-GMs content. Bars and whiskers represent mean and standard errors, respectively. * $p \leq 0.05$, T-test.

We also confirmed the absence of replication competent lentiviruses (RCLs) following transduction of human PB lymphocytes with *FANCA-LV*. The *FANCA-LV* supernatants were positive for p24 detection by commercial ELISA and so were the medium sampled from the cell cultures immediately after transduction. In the experiments with the higher virus load, vector capsids could be detected one week after transduction but their inability to generate replication competent lentiviruses forced the loss of signal in the following passages, **figure 21**.

A set of 8 secondary recipients were also tested after long time engraftment for the evaluation of RCLs. Concordantly, ELISA detection of vector particles conducted in the serum of treated animals could not trace any remaining vector in the serum from these recipients.

We therefore confirmed the absence of *FANCA*-LV vector replication, as expected from a 3rd generation SIN-LV.

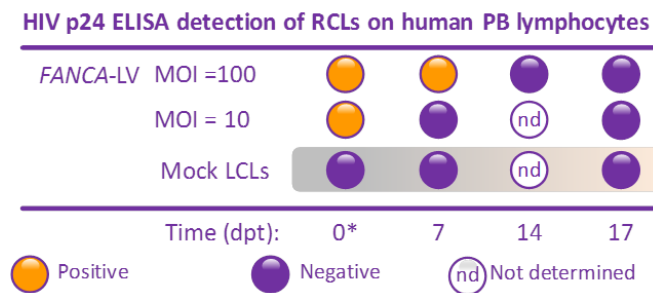


Figure 21.- Detection of replication competent lentivirus (RCLs). PB lymphocytes were transduced at the indicated multiplicities of infection (MOI), and SNs were collected at 0, 7, 14 and 17 days post transduction (dpt) and processed for ELISA detection of HIV p24 proteins, evidencing the absence of replication competent lentivirus (RCL). * SN collected after first cell-wash.

1.2.3.- Sustained detection of the *FANCA*-LV in primary and secondary *Fanca*^{-/-} recipients

Persistence of the LV-corrected *Fanca*^{-/-} cells upon serial transplantation was studied routinely in recipients' PB samples and BM at end-point analyses. These samples were also tested to confirm the absence of vector clearance due to intrinsic toxicity, **figure 22**.

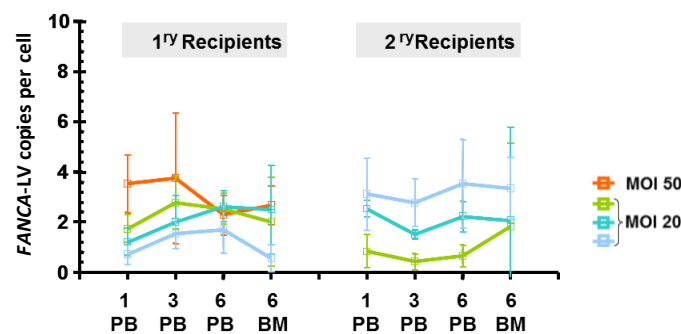


Figure 22.- Detection of *FANCA*-LV in *Fanca*^{-/-} recipients' PB and BM cells. Blood samples were harvested at 1, 3 and 6 months post-transplant and BM extracted at end-point analyses. The number of proviral copies per cell was determined by qPCR on gDNA by comparison of *FANCA*-LV and endogenous *Gapdh* gene.

The VCN determined in separate experiments, in which we used the pre-GMP batch and the same MOI, evidenced that despite small inter-experiment variations between them, the VCN was maintained over time in absence of gross increases or decreases of the vector signal.

1.2.4.- Biodistribution of *FANCA*-LV cells after serial transplantation

An important part of the characterization of *FANCA*-LV corrected *Fanca*^{-/-} cells as medicament is their biodistribution. To gain insight on the fate of *FANCA*-LV treated cells we carried out qPCR determination of the LV sequences in a range of tissues from secondary recipients. End point analyses of secondary recipients were negative for vector sequences integrated in non-hematopoietic tissues. Liver is a highly irrigated organ, and therefore we detected some vector sequences in these organs from secondary recipients.

In addition to transplants in which we infused male donor cells into female recipients, in parallel experiments, we also looked for *FANCA*-LV copies in *Fanca*^{-/-} male recipients, **figure 23**. In this experiment we tracked the vector in hematopoietic tissues, brain and gonads from recipients one month after receiving lin⁻ BM cells transduced with *FANCA*-LV. Brain and gonad samples were

negative for the presence of the vector again, **figure 23**.

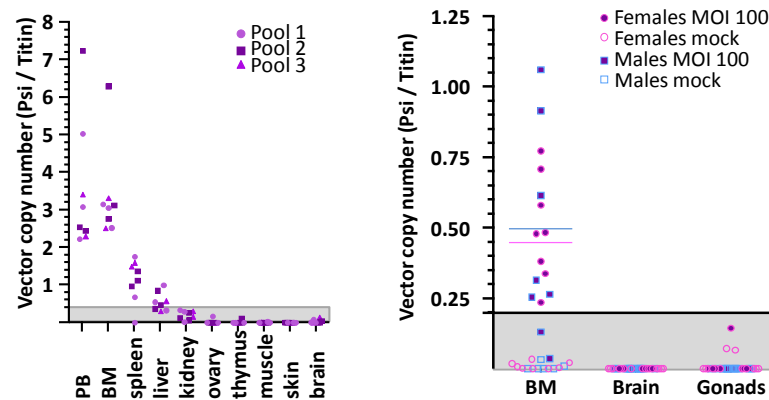


Figure 23.- Biodistribution of *FANCA*-LV in different tissues from mice treated by gene therapy. *FANCA*-LV specific sequences were amplified by qPCR. (Left) Hematopoietic and non-hematopoietic organs of several secondary recipients belonging to 3 different BM pools from experiment L5 were harvested and processed at end-point analyses. (Right) In a separate experiment wt male and female mice were infused with *FANCA*-LV modified cells and the presence of the vector was tested 1 mpt. Ranges under the detection limit are grey shaded.

1.2.5.- *Fanca*^{-/-} recipients engrafted with gene corrected cells display a healthy phenotype

BM samples from primary and secondary recipients subjected to the gene therapy protocol were tested *in vitro* to confirm reversion of FA phenotype. We harvested *Fanca*^{-/-} BM after long-term engraftment, in primary and secondary recipients and challenged with MMC.

Same numbers of BM cells were seeded on methylcellulose plates where MMC was added. The survival curves of CFCs were scored one week after adding the DNA cross-linking agent, **figure 24**.

Remarkably, correction of FA CFCs hypersensitivity to ICLs was evident in both primary and secondary recipients long-term after transplantation of the *FANCA*-LV corrected cells. These results demonstrated the functionality of the vector to restore FA deficiencies permanently and also the unaltered properties of the *FANCA*-LV corrected HSCs, which can engraft recipients' BM to produce healthy hematopoiesis.

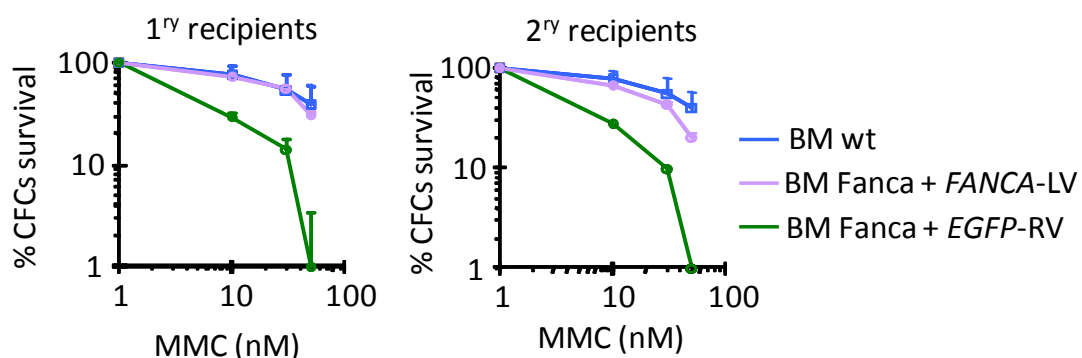


Figure 24.- Therapeutic MMC protection in long-term engrafted *FANCA*-LV corrected cells. After long-term engraftment, total BM homogenates from (left panel) primary and (right panel) secondary recipients fostering gene modified cells were harvested and CFCs cultures seeded into methylcellulose plates with increasing doses of MMC. Sensitivity was calculated plotting the surviving fraction of CFCs and the MMC dose applied. Mean and standard errors are shown.

Taken together, the infusion of *FANCA*-LV corrected lin⁻ BM cells protected *Fanca*^{-/-} recipients from myeloablative conditioning, promoting a healthy hematopoiesis concurring with a sustained

detection of gene modified cells in PB and BM of the recipient mice. Besides, based on the p24 analyses, we can conclude that *FANCA*-LV is unable to generate RCLs. Moreover, the permanent labeling of *FANCA*-LV transduced cells did not have a toxic effect on content of progenitors within the recipients' BM. While the integrated LV provirus was observed in hematopoietic tissues such as PB, BM and spleen, no significant signals from the LV were detected in non-hematopoietic tissues. Thus, these results demonstrate that the genetic correction of *Fancc*^{-/-} HSCs with the *FANCA*-LV confers a stable phenotype reversion of these cells *in vivo* without any significant toxicity.

1.3.- INSERTIONAL REPERTOIRE OF *FANCA*-LV UPON SERIAL TRANSPLANTATION IN *Fancc*^{-/-} MICE UNCOVERS SIGHTS OF HEALTHY HEMATOPOIESIS

Linear amplification mediated PCR (LAM-PCR) is a powerful tool for the analysis of retrovirally marked individual clones from pooled populations. We used vector specific LAM-PCR amplification on DNA isolated from PB and BM samples from pre-GMP *FANCA*-LV and control *EGFP*-RV cohorts in order to compare clonal kinetics. A total of 72 mice were analyzed from different experiments, see **table 15**.

Table 15.- Mouse samples processed for LAM-PCR analyses.

Groups	Pre	1 ^{ry} recipients	2 ^{ry} recipients	BMT type	Mappable reads	Unique IS
<i>FANCA</i> -LV						
L1		2	n/a	n/a	14.735	126
Pre-GMP <i>FANCA</i> -LV						
L2	1	5	3	Both	73.906	836
L3		7	9	Both	58.690	978
L4		8	7	Pooled	41.873	1.692
L5		9	6	Pooled	32.923	1.566
Total LV	1	31	25	Both	222.127	5.198
<i>EGFP</i> -RV						
R1		8	8	Pooled	10.690	160

Five independent experiments of serial long-term transplantation with pre-GMP *FANCA*-LV and one *EGFP*-RV transduced cells were included in these analyses. Serial BMT was performed either individually, by using a mouse to mouse BMT approach, by pooling equal number of primary BM cells, or by combining both types of procedures in separate secondary recipients.

1.3.1.- High throughput analysis of LV and RV integration sites in transduced *Fancc*^{-/-} cells

Genomic DNA samples were isolated from PB cells obtained at periodic intervals after BMT and also from BM collected at the sacrifice of the recipients, see **table 15**.

LAM-PCR allows the amplification of short DNA sequences flanking the vector LTRs. The identity of these PCR products depends solely on the sequence targeted by the vector, while the length of LAM-PCR products depend on the *loci* and the distance to nearest restriction motifs corresponding to the enzymes used to link a specific cassette for the nested exponential amplification. Thus, different integrations processed with the same protocol should produce different bands in the electrophoresis gels, as observed in the LAM-PCR products from recipients with similar engraftment levels, **figure 25**.

The electrophoretic resolution of *EGFP*-RV samples displayed an oligoclonal restricted pattern in which few bands were present in each sample. Besides, most bands were repeatedly noticed in primary and secondary recipients from the same experiment, **figure 25**.

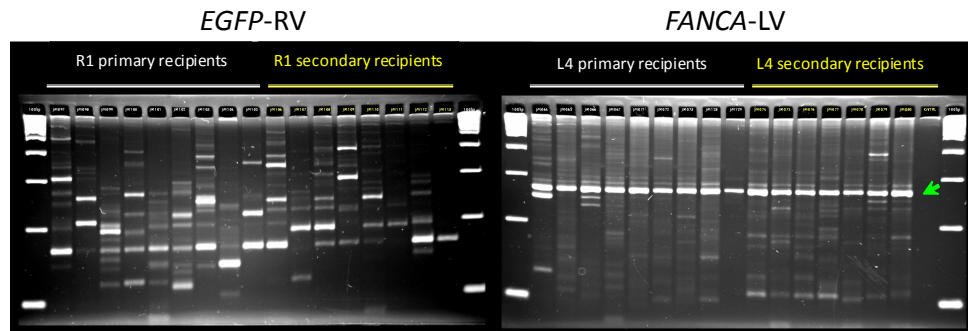


Figure 25: LAM-PCR products showing the clonal repertoire of hematopoietic samples from recipients transplanted with *Fanca*^{-/-} lin⁻ BM cells transduced with *EGFP-RV* or *FANCA-LV*. Spreadex agarose electrophoresis gels were used to resolve LAM-PCR products. *EGFP-RV* transplanted mice (**left**) showed a limited clonal content in both primary and secondary recipients while *FANCA-LV* samples (**right**) exhibit a highly polyclonal smear distribution. Green arrow, inner control band of Mse I LAM-PCR.

In contrast, LAM-PCR products from *FANCA-LV* transduced samples exhibited a highly polyclonal profile, forming smears due to the presence of numerous bands in samples from both primary and secondary recipients, **figure 25**.

LAM-PCRs were performed on each sample using two different enzymes (Tsp90I and MseI) and then processed for pyrosequencing in the Roche 454 platform using Titanium® mega primers to individually codify each sample, following the diagram of **figure 26**.

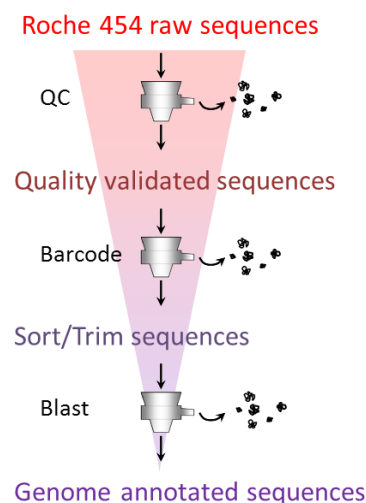


Figure 26.- Step-wise automatic pre-processing of LAM-PCR reads. Raw sequences from the pyrosequencer need to match quality control (QC) in size and reliability. Only quality validated sequences are kept for the next step, in which the “megaprimer” used to tag and prime sequencing of the DNAs is identified within the DNA sequence, as well as the LTR sequences used to prime the linear PCR reaction. Sequences positively tagged according to their origin by their “barcode” were searched for genomic DNAs (sequences between the linker primer and the LTR primer) which were aligned in the mouse genome data base to retrieve their location. Only unequivocally genome annotated sequences were considered. The final dataset included biological relevant data such as position and orientation of each discrete insertion and relevant genomic features nearby, such as RefSeq genes, CpG islands and promoters.

Parallel sequencing of all samples yielded over 250,000 raw sequences, which were trimmed and filtrated to allow alignment on the mouse genome. Each sequence successfully sequenced and mapped (“read”) was thus annotated and listed for further analyses. Reads in the same chromosome, orientation and position (± 4 bp) were considered the same lentiviral insertion site (LIS). We kept the record of coincident LIS to allow clonal analyses. Concordantly with

electrophoresis, from the RV treated mice we retrieved a mean of 10 mappable retroviral insertion sites (RIS) per sample, while LV treated samples yielded an average of 97 different LIS per sample.

1.3.2.- Analysis of the insertional profile in hematopoietic samples from *Fanca*^{-/-} mice transplanted with gene corrected syngeneic HSCs

We described chromosomal distribution of the validated LIS/RIS in the transplanted animals. Fewer than 15% of the LIS were found within a 10 Kb window from the transcription start sites (TSS) described in the mouse genome, **table 16**. Similarly, only a small fraction of the validated LIS was located in the vicinity (± 10 Kb) of known CpG islands, **table 16**.

RIS distribution, however, was enriched around TSS, as deduced by the fact that more than 15% of RIS were located within 10 Kb from TSS. However, a limited number of RIS were validated. This was consistent with the oligoclonal pattern of repopulation seen by electrophoretic resolution of the γ -RV LAM-PCR products.

Table 16.- LIS/RIS distribution in the *Fanca*^{-/-} BMT model.

	Validated IS		± 10 Kb TSS		± 10 Kb CpG	
Pre-GMP <i>FANCA</i> -LV	# LIS		# LIS	%	# LIS	%
1 ^{ry} recipients	7513		1056	14.06	1104	14.95
2 ^{ry} recipients	1369		170	12.42	180	13.15
<i>EGFP</i> -RV	# RIS		# RIS	%	# RIS	%
1 ^{ry} recipients	118		19	16.10	18	15.25
2 ^{ry} recipients	62		7	11.29	8	12.90

The chromosomal distribution of the LIS retrieved from either primary or secondary recipient samples accommodated to a random profile generated *in silico* from a 10,000 random mappable ISs. Remarkably, no gross differences due to long-term engraftment and selection could be noted in the validated LIS, **figure 27**.

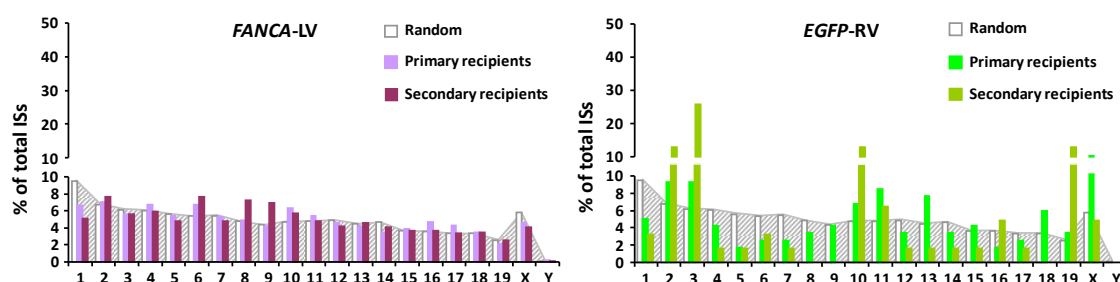


Figure 27.- Descriptive distribution of LIS and RIS within the mouse chromosomes. The distribution of LIS and RIS in chromosomes from cells obtained from either primary or secondary recipients is shown. **(Left)** *FANCA*-LV exhibits a likely random chromosomal distribution in both primary and secondary recipients. **(Right)** However, this was not the case with the *EGFP*-RV.

However, the RIS exhibited an uneven distribution, which became exacerbated in samples from secondary recipients, with overrepresentation of RIS in chromosomes 2, 3, 10 and 19 in secondary recipients, **figure 27**.

The distribution of LIS and RIS clearly differs from each other and suggests different selection dynamics for the LV and γ -RV transduced *Fanca*^{-/-} cells undergoing long-term engraftment and serial BMT.

1.3.3.- The analysis of the insertional profile defines clusters in *Fanca*^{-/-} HSCs

Retroviral integrations coexisting in statistically significant proximity can be clustered together describing common insertion sites (CIS). The number of independent IS belonging to a defined CIS characterizes its order. Analyses of the 6,658 LIS disclosed that 50% did not form CIS while the other half were grouped into CIS, from which 26% (1,763 LIS) were under 4th order and the other 21% (1,420 LIS) belonged to $\geq 4^{\text{th}}$ order CIS, **figure 28**. The CIS above 4th order are listed in **supplemental table S1**. We examined whether the high order CIS were enriched in growth and survival factors listed in cancer databases. Over 70% of the high order CIS in our LIS did not hit genes listed in the retrovirus and transposon tagged cancer genome database (RTCGD) or in cancer genes listed in the clinical genome database (CGD), **supplemental table S1** and **figure 28**.

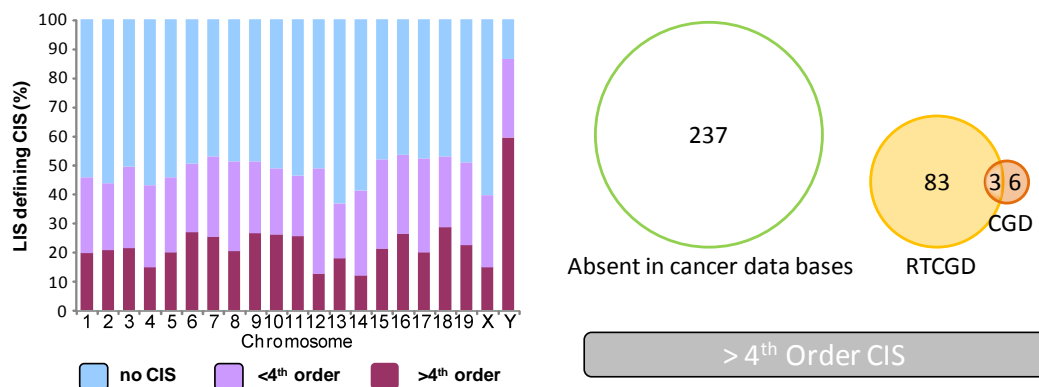


Figure 28.- Common insertion sites described by FANCA-LV LIS in a *Fanca*^{-/-} transplant model. 2nd order CIS (2 LIS within 50 Kb); 3rd order CIS (3 LIS within 100 Kb); and $\geq 4^{\text{th}}$ order CIS (>3 LIS within 200 Kb) were described using the topologic information of the LIS annotated. **Left**, CIS content per chromosome. CIS of 4th order and upper were compared with RTCGD and cancer dataset from CGD, but only 89/326 were matched in either databases and only 3/326, matched both.

The only three CIS matching both databases (Fli1, Mlt3 and Plag1) were not dominant clones in their respective recipients. For most of the LIS in these CIS, detection was transient in primary recipients and did not show spread across BMT. This was the case of LIS hitting Plag1 that reached a clonal representation of 6.58% in PB of one recipient at 1 mpt, but were not detected again in the same recipients in PB at 3 and 6 mpt neither in BM at end point analyses. Only in the case of Fli1, present in one primary recipient's BM transplanted as part of a pool into 4 secondary recipients. Three of these recipients had detectable levels of Fli1 CIS integrations representing a clonal contribution ranging from 0.3 to 0.5%. The highest clonal contribution of LIS targeting Mlt3 CIS was obtained in one secondary recipient, in which the LIS targeting Mlt3 CIS described 1.82% of all validated reads.

From these analyses, we can remark that a high proportion of the LIS listed in *Fanca*^{-/-} repopulating cells clustered together, describing >4th order CIS. However, most of genes affected by high order CIS were not listed in oncogene data sets. Interestingly, the few genes affected by high order CIS that matched the two different cancer databases studied did not have a clonal behavior suggestive of clonal dominance or dysplasia.

1.3.4.- Ingenuity pathway analysis

To analyze the function of genes susceptible to be transactivated by the LV insertions, we selected 2,423 genes, which harbored an insertion of the FANCA-LV within 50 kb upstream of TSS. This dataset was the input for the ingenuity pathway analyses (IPA) software that found the key

functions that embrace the genes targeted by our LIS, **supplemental table S2**. For comparison, we performed the same analyses with 3,321 genes that we obtained from 10,000 random insertion sites generated by computer simulation, **supplemental figure S1 B**. The analyzed LV tagged genes from the *Fanca*^{-/-} mice and random data set were assigned to 499 and 580 functional gene categories respectively. From these categories only 1/3 overlapped which each other, while 390 and 393 functional categories were unique for either *FANCA*-LV or the random dataset, **supplemental figures S1 A, B and C**. The overlapping functional categories were discarded and we focused on the functions not represented in the random dataset. Interestingly, the LIS targeted genes derived from *Fanca*^{-/-} mice treated by gene therapy revealed enrichment in functional categories involved in recombination, DNA repair and also genes involved in hematopoiesis and related to differentiation, development and homeostasis, **figure 29** and **supplemental figure S1 A**. However, when we applied the same analyses to the published integrome from a β -Thalassemia gene therapy that used a SIN-LV in a mouse model (Ronen et al., 2011), a pattern of enriched functional categories similar to the ones highlighted for FA was observed **figure 29**.

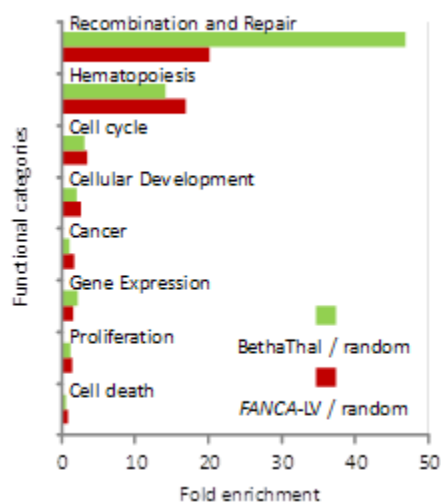


Figure 29.- Overview of the ingenuity pathway analysis (IPA). LIS within 50 Kb from TSS were selected for IPA analyses and the resulting categories compared with an *in silico* generated random profile. The same analyses were performed with a published integrome from the preclinical studies of β -Thalassemia (Ronen et al., 2011). A selection of functional categories enriched in the preclinical datasets versus the random control is displayed.

1.3.5.- Clonal analyses of *FANCA*-LV transduced cells exhibit a healthy clonal HSC turnover in *Fanca*^{-/-} recipients

Distribution of the RIS and LIS according to the times and samples studied can be of utmost importance to understand clonal dynamics of the transplanted HSCs. We studied the LIS annotated in each individual recipient and sorted them according their recurrence along the study times and their persistence across serial transplantations. The continuous supply of newly annotated transient LIS evidenced a continuous turnover of clones leading to PB cell production. Significantly, over 40% of LIS detected in our experiments corresponded to transient clones which were not present in two or more primary recipients nor in the BM from their corresponding secondary recipients. This behavior may be likely due a healthy renewal of active and quiescent HSC, **figure 30**.

Sequential PB sampling of recipients also evidenced a reduction on the repertoire of LIS detected over time, consistent with HSC ageing. Furthermore, BMT considerably reduced the number of marked HSC clones, selecting a pattern of oligoclonal repopulation. Notably, even after

transplantation of BM pools into secondary recipients we could retrieve novel LIS, undetected in primary recipients, indicating that *FANCA*-LV targeting of *Fanca*^{-/-} HSC clones allowed a healthy generation of marked HSCs without clonal dominance, **figure 30**.

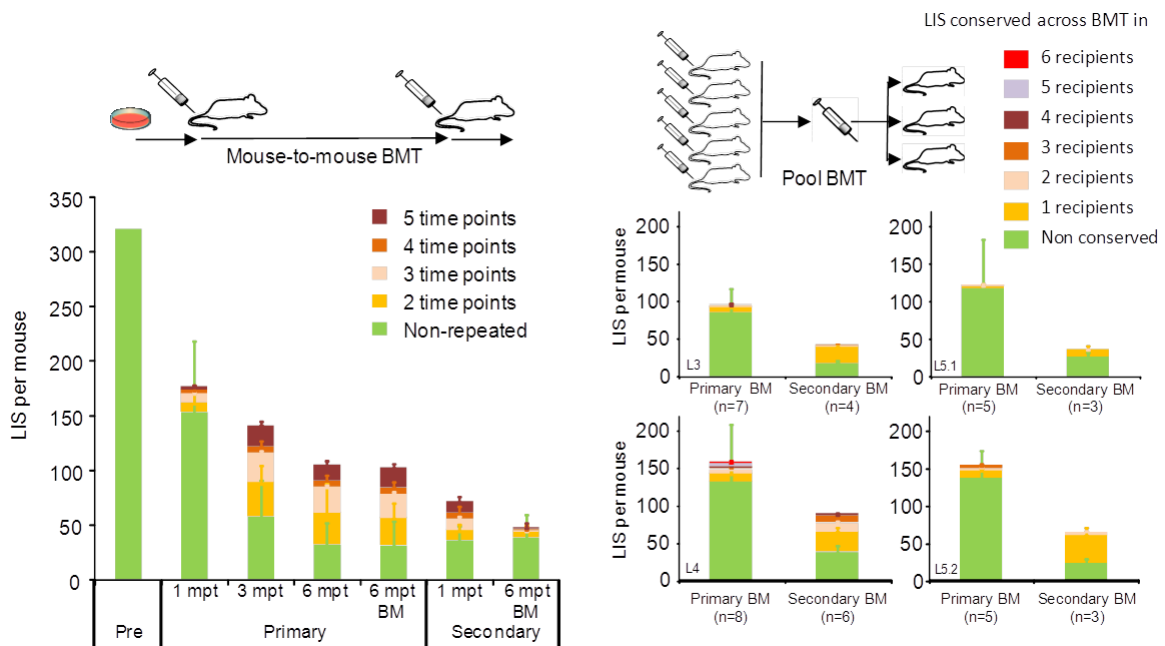


Figure 30.- Clonal turnover of *FANCA*-LV transduced HSCs. Annotated LIS were catalogued according to its host and time point of collection. **Left panel:** Analysis of 7 primary recipients (from 2 separate experiments), including 3 secondary recipients that had undergone individual BM transplantation. LIS appearing in pre-BMT, PB at different times post-transplantation and BM corresponding to primary and secondary recipients are color coded according to their recurrence over time. All LISs sequenced only in one single sample and timepoint are colored in green. **Right panels:** Different experiments in which BMT were performed with pooled primary recipients' BM. The graphs also evidence dynamic relay of clones exclusively found in secondary or primary recipients. Color code labels the clones in each recipient according to the number of other samples matching the same LIS across the BMT. Means and standard errors are shown. The number of recipients analyzed is indicated in parenthesis.

In the case of *EGFP*-RV marked cells, new RIS could be detected in secondary recipients, **figure 31**. However, this fact was blurred by the strong oligoclonality and selection evidenced by *EGFP*-RV secondary recipients in whom several RIS detected in the primary recipients' BM were spread among several secondary recipients (7 out of 8 in the case of *Evi1* dominant clones).

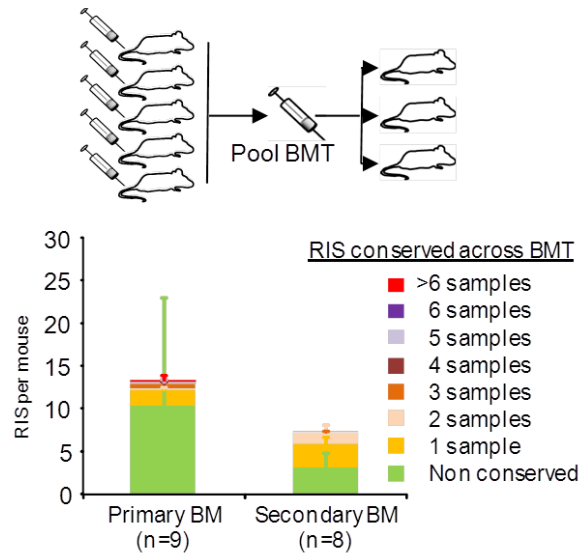


Figure 31.- Clonal turnover of *EGFP-RV* cells. Annotated RIS were catalogued according to its host. We analyzed 17 *EGFP-RV* recipients: 9 primary recipients, whose BM were pooled and transplanted, and the 8 secondary recipients that received the BM pool cells. Genes targeted by RIS only in one single recipient are colored in green. The RIS that were widespread across the BMT are color coded according to the number of recipient or donor BM matching the same RIS. Means and standard errors are shown. The number of recipients analyzed is indicated in parenthesis.

1.3.6.- Clonal kinetics in *Fancc*^{-/-} mice show a polyclonal repopulation pattern of corrected cells in contrast to the oligoclonal repopulation of *EGFP-RV* transduced HSCs

The read counts determined the clonal contribution of the LIS identified in the LAM-PCRs. Attending to this retrieval frequency, we focused on the top 10 major LIS in the pre-transplanted BM cells as well as in the periodic PB samples and end-point BM cells from primary and secondary recipients that had been transplanted individually. The detailed track of top 10 contributing LIS in all transplanted animals disclosed the hematopoietic clonal kinetics of major contributing HSCs. No LIS identified in the pre-transplant BM were retrieved again in BM samples from transplanted mice, **figure 32** and **33**. Together with continuous renewal of major contributing clones, we frequently observed the expected coincidences between the top 10 clones in both PB and BM samples.

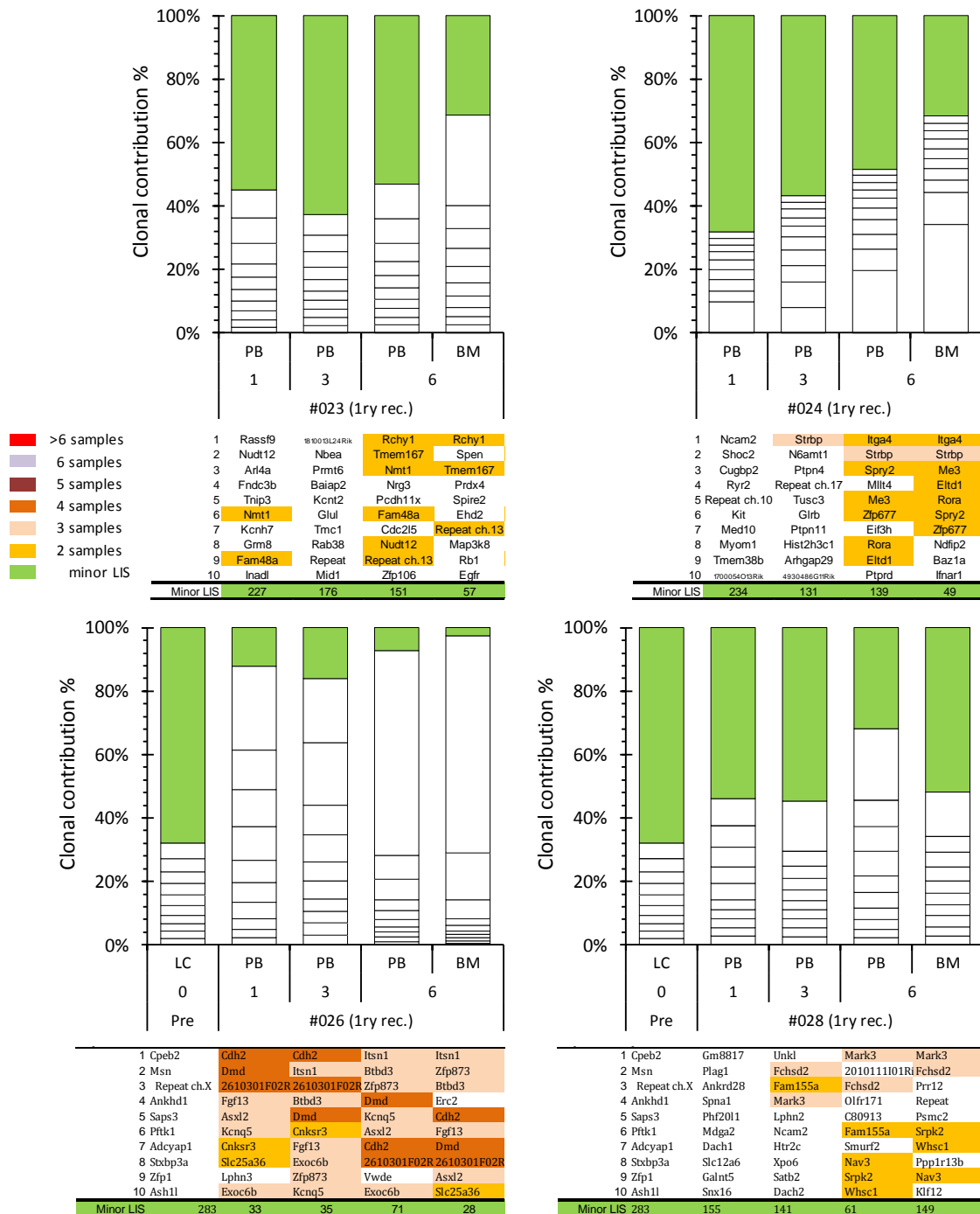


Figure 32.- Clonal dynamics of top 10 LIS in FANCA-LV corrected recipients over time. The contribution of 10 most frequently retrieve LIS is represented. Top 10 LIS charts of primary recipients from experimental lot L1 and L2 (including the pre-culture in L2). The tables under the bar-graphs listing the genes targeted are color-coded according to LIS recurrence. LC, liquid culture; PB, peripheral blood; BM, bone marrow. 0, 1, 3 and 6 indicate the time of collection: months after transplantation.

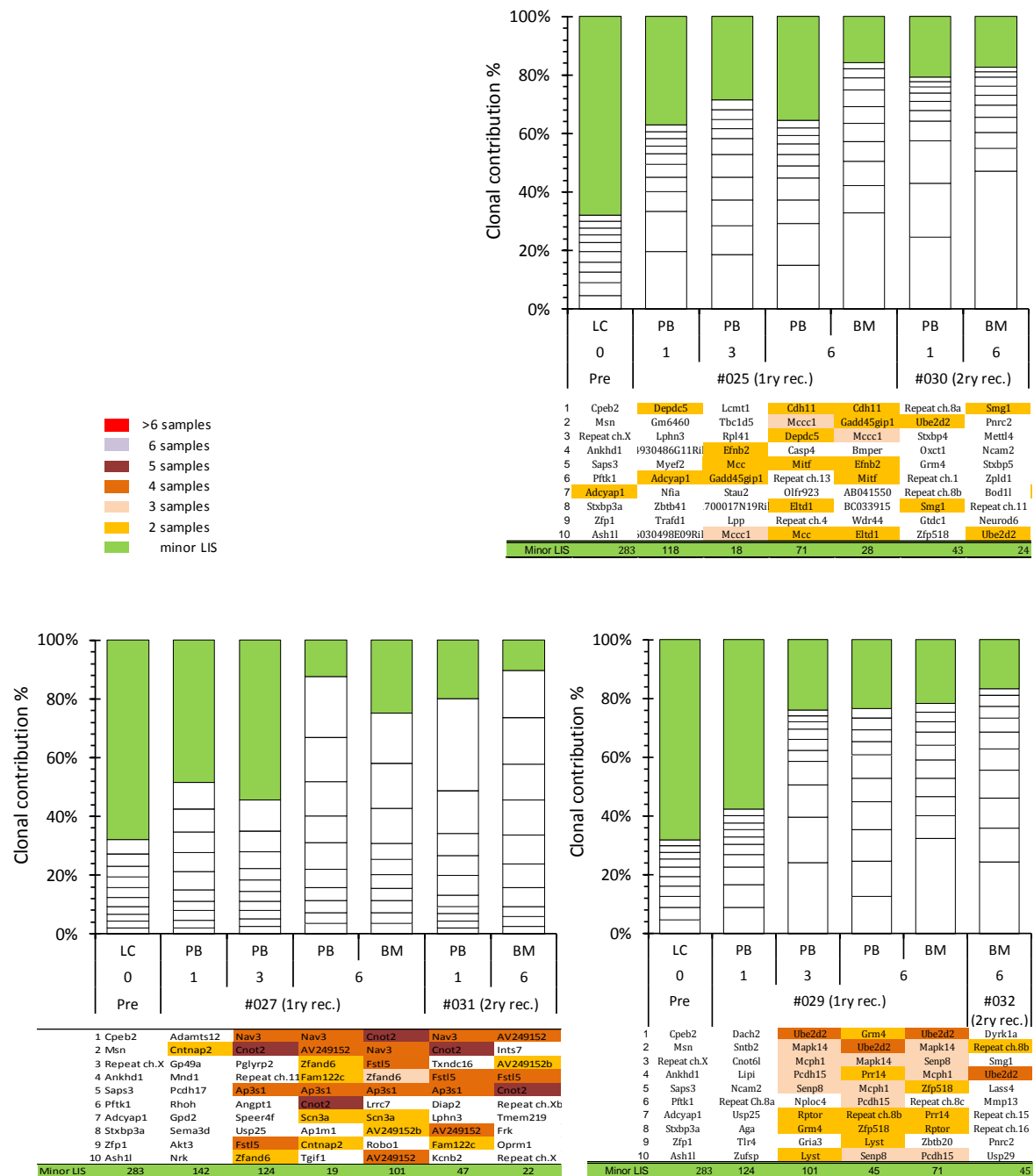


Figure 33.- Clonal dynamics of top 10 LIS in FANCA-LV corrected recipients over time. The contribution of 10 most frequently retrieve LIS is represented. Top 10 LIS charts pre-culture, primary and secondary recipients from experimental lot L2, which underwent individual mouse-to-mouse BM transplantation. The tables under the bar-graphs listing the genes targeted are color-coded according to LIS recurrence. LC, liquid culture; PB, peripheral blood; BM, bone marrow. 0, 1, 3 and 6 indicate the time of collection: months after transplantation.

We were interested in the selective pressure conferred by the long-term engraftment and serial transplantation on FANCA-LV corrected *Fanca*^{-/-} cells. Hence, we examined the top 10 LIS/RIS in BM samples collected at end-point analyses from primary and secondary recipients. Individual mouse to mouse BMT demonstrated arousal of novel clones after the BMT, **figure 34 A**.

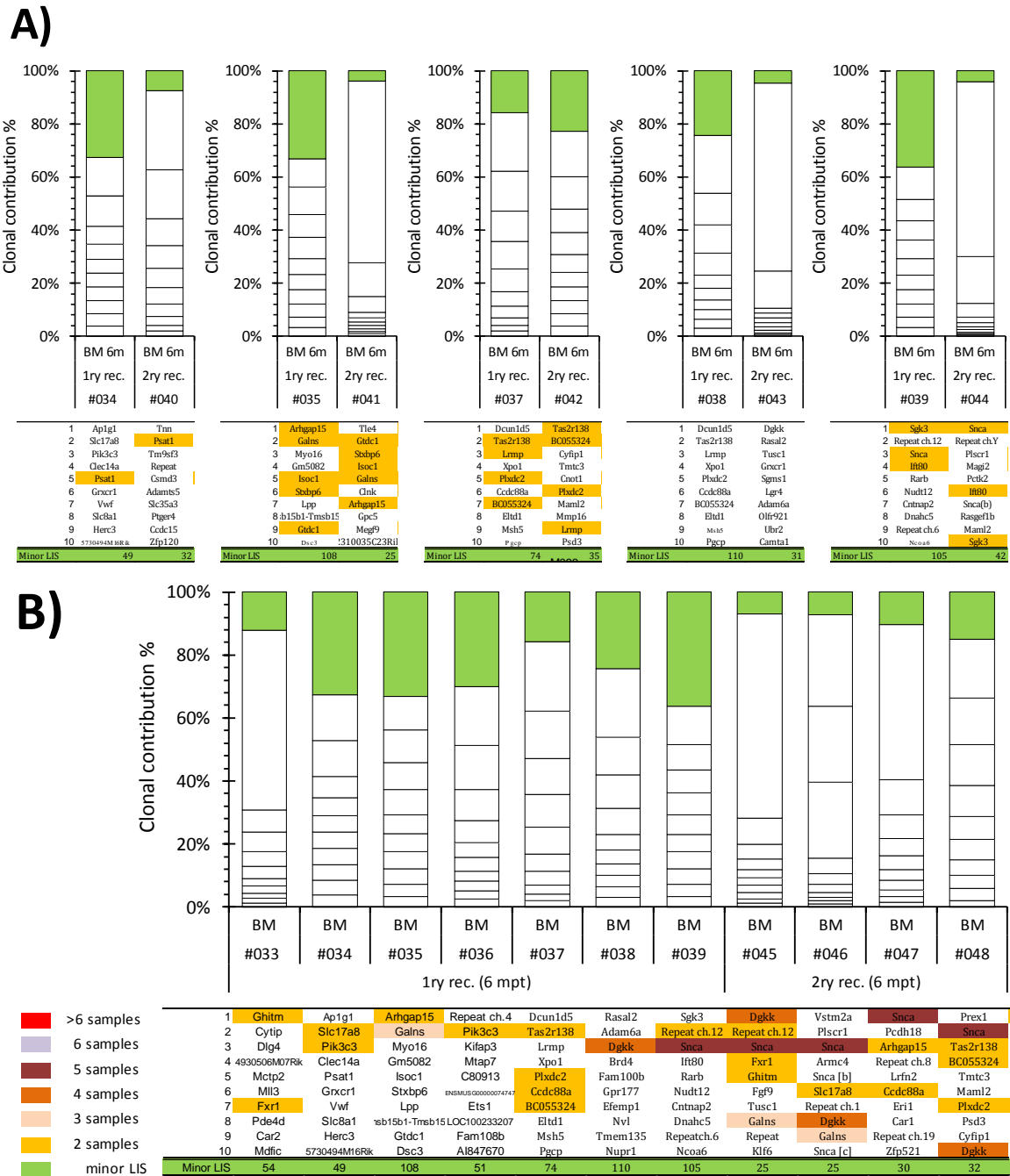


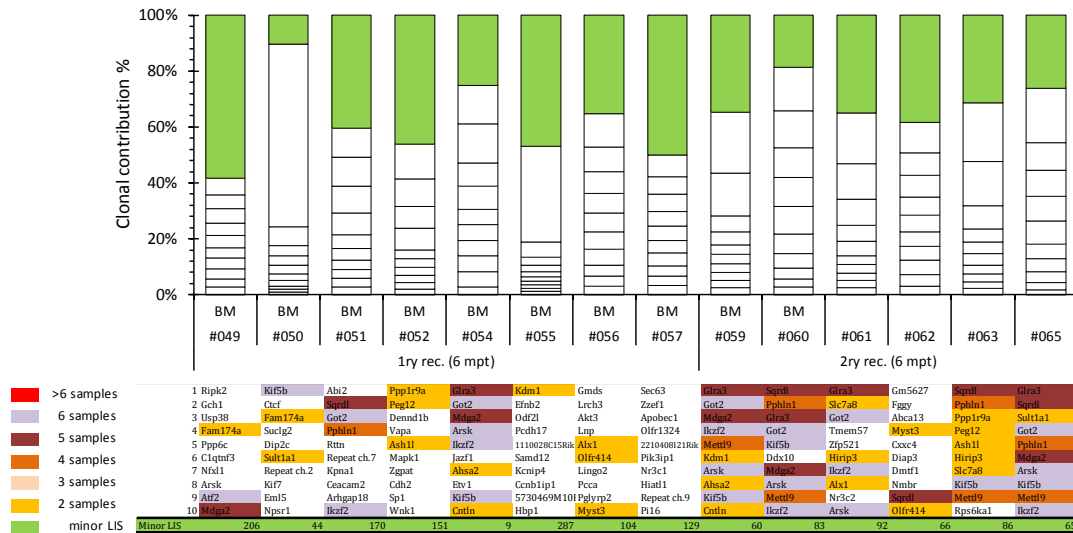
Figure 34.- Kinetics of major *FANCA*-LV corrected clones across BMT. The contribution of the 10 most frequently retrieved LIS in end-point analyses' BM of primary and secondary recipients is represented. **A)** Pairs of individually transplanted primary and secondary recipients from experiment L3. **B)** Primary and secondary recipients subjected to pooled BM transplantation in the experimental lot L3. The tables under the graphs listing the targeted genes are color-coded according to LIS recurrence. BM, bone marrow. 0, 1, 3 and 6 indicate the time of collection: months after transplantation.

LIS analyses also evidenced that serial BMT and the long-term engraftment in the *Fancc*^{-/-} recipients notably reduced the overall number of detectable LIS in secondary recipients' BM. After transplantation of pooled BM from primary recipients, LV marked clones with the highest retrieval frequencies in independent pool BMT, **figure 32, 33 and 34**, showed very low overlap with the most represented clones in their corresponding primary recipients. In the representative

experimental cohort in **figure 34** bottom, only 8 out of 30 top 10 LIS in the secondary recipients were repeated.

In one *FANCA*-LV experiment in which pooled BMT was performed, **figure 35** top, three top 10 IS clones could be detected which were widespread in secondary recipients, in 5 out of 7 individuals.

A)



B)

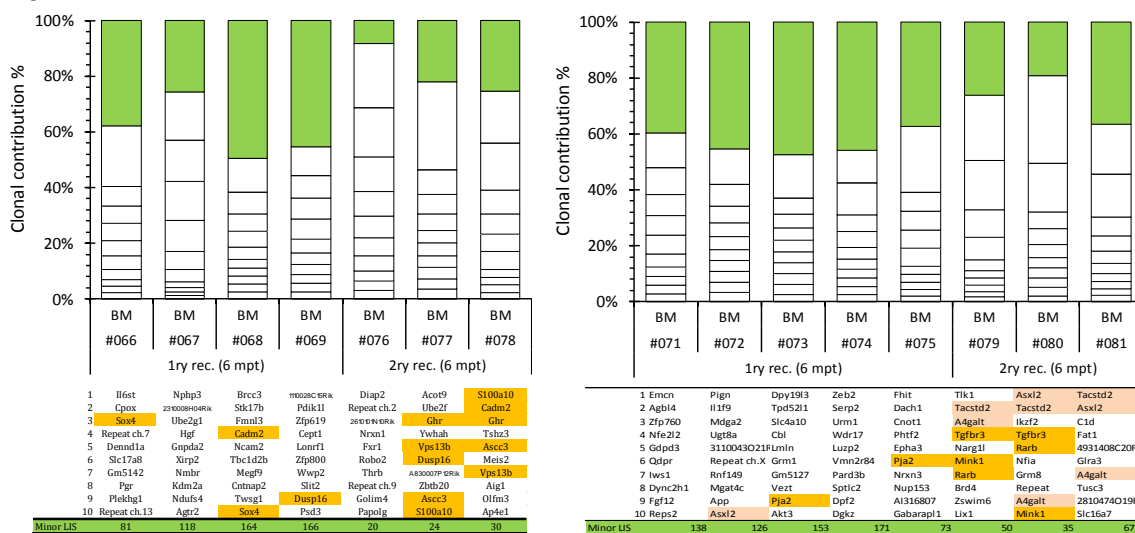


Figure 35.- Kinetics of major *FANCA*-LV corrected clones across pooled BMT. The contribution of the 10 most frequently retrieved LIS in end-point analyses' BM of primary and secondary recipients is represented. **A)** Primary and secondary recipients from pooled BM transplantation in the experiment L4. **B)** Primary and secondary recipients from pooled BMT in the experimental lot L5. The tables listing the targeted genes are color-coded according to LIS recurrence. BM, bone marrow; mpt, months after transplantation; rec., recipient

These LIS were placed into the intron 5 of *Gtra3*, upstream of *Sqrdl* and upstream *Got2*. Despite being major clonal contributors in several secondary mice, these targeted genes have not been reported to be located in CIS on cancer databases, reducing the possibility that they could

collaborate to malignant survival or outgrowth. Besides, none of these clones surpassed 20% of contribution and all coexisted diluted in a polyclonal repertoire, **figure 35**.

Marked differences in the behavior of *EGFP-RV* and *FANCA-LV* transduced *Fanca*^{-/-} cells were observed also with respect to top 10 clonal analyses. In the γ -RV cohort, which presented an evident clonal unbalance (**figure 25** and **32**), RIS targeting *Evi1* locus were among the top 10 contributors in several recipients, **figure 36**.

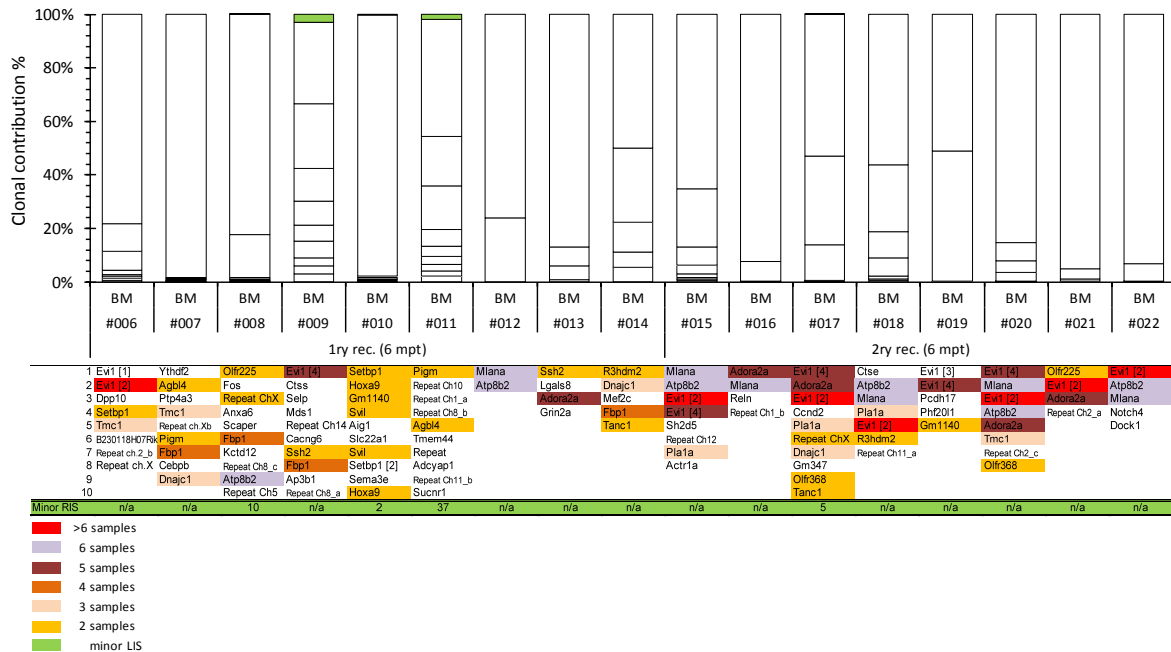


Figure 36.- Kinetics of major *EGFP-RV* corrected clones across pooled BMT. The contribution of the 10 most frequently retrieved RIS in end-point analyses' BM of primary and secondary recipients in the experimental lot R1 are represented. The tables listing the targeted genes are color-coded according to RIS recurrence. BM, bone marrow; mpt, months after transplantation; rec., recipient

It is noticeable the limited oligoclonal repertoire of RIS repopulating the *Fanca*^{-/-} recipients, with only 3 out of 8 primary recipients harboring over 10 detected RIS. In addition, the clonal content presented strong preferences, resulting dominant clones surpassing 50% of clonal contribution in all secondary recipients. The common cut-off to set clonal dominance in human hematopoietic reconstitution is 20%.

Opposing to the γ -RV, **figure 36**, we only identified 31 genes targeted by LIS with estimated clonal contributions over 19%, **supplemental table S3**. Half of the samples harboring any of these highly retrieved LIS corresponded to primary recipients (21) and the other half (20) to secondary recipients.

This discards that the presence of dominant clones was a consequence of the selection and loss of clones during the BMT. We performed a query in RCGD for the genes targeted in the 31 dominant clones listed in **supplemental table S3** and only 3 were confirmed CIS in this database (*Il5st*, *Tnn* and *Ube2d2*). This distinguishes RIS and LIS behavior as RIS targeting *Evi1*, a well-represented CIS in the RCGD, are frequent between top 10 clones in the secondary recipients. In some cases, *EGFP-RV* recipients harbor more than one single RIS close to *Evi1*, **figure 36**.

To sum up, samples from 56 and 16 recipient mice transplanted with *FANCA-LV* and *EGFP-RV* transduced BM, respectively, were positively amplified by LAM-PCR and sequenced using NSG

technologies, yielding close to 250,000 mappable sequences to allow further studies.

The pattern of integration in the mouse chromosomes significantly differed in the LIS and the RIS dataset. Besides, LVs exhibited a strong polyclonality while RVs induced a strong oligoclonality in the HSCs repopulating pattern. Moreover, the *FANCA*-LV IPA profile in *Fanca*^{-/-} was enriched in genes involved in recombination, DNA repair, hematopoiesis, differentiation, development and homeostasis. This IPA profile was, however, not exclusive of the *FANCA*-LV in *Fanca*^{-/-} HSCs, which may resemble interactions of lentiviral vectors with specific chromatin features in mouse HSCs.

Based on all this integration analyses we can conclude that the transplantation of *FANCA*-LV corrected *Fanca*^{-/-} HSC results in a healthy polyclonal long-term repopulation pattern in *Fanca*^{-/-} recipients.

2.- GENERATION OF iPSC LINES FROM *Prkdc*^{scid} SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENT MICE

Induced pluripotent stem cells, also referred as iPSCs, are generated through the expression of a set of transcription factors that delete cell identity, hence, leading to an undifferentiated pluripotent steady state equivalent to the one described for embryonic stem cells (ESCs) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Additionally, different adult cell types, as hematopoietic progenitors, could also be obtained through the differentiation of gene corrected iPSC cells (Raya et al., 2009).

DNA-PKcs deficiency seriously impacts in the hematopoietic system, mostly in the generation of B and T cells, but also the HSCs (Bosma et al., 1983; Biedermann et al., 1991; Blunt et al., 1995; Araki et al., 1997; Qing et al., 2012), causing a T^BSCID syndrome in human patients (van der Burg et al., 2009). Generation of DNA-PKcs deficient iPSCs, may therefore provide a relevant tool to improve the knowledge of the implications of this NHEJ protein in the generation and maintenance of cell pluripotency. Scid iPSCs may also constitute a valuable platform to evaluate the feasibility of future cell therapies based on the generation of HSC derived from patient-specific iPSC lines.

2.1.- GENERATION OF WT iPSC CLONES WITH REPROGRAMMING LENTIVIRAL VECTORS

The groundbreaking experiment by Takahasi and Yamanaka in 2006 that defined the iPSCs used different RVs for the delivery of four cell reprogramming factors: *Oct3/4*, *Klf-4* (*Pou5f*), *Sox2* and *c-Myc* (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Recently, more sophisticated and optimized LVs have been designed for the same purposes (Sommer et al., 2009; Sommer et al., 2010).

2.1.1.- STEMCCA reprogramming-LV

The VSV-G pseudotyped STEMCCA LVs, that carry the four reprogramming factors published by Yamanaka, were concentrated and titers were estimated in HT1080 cells 10 days after transduction. The titer of each batch was calculated by qPCR. We also used flow cytometry analyses to determine the titer of STEMCCA mCherry LVs, which in addition to the three reprogramming factors harbors the mCherry marker gene.

Firstly, we wanted to set up a cell reprogramming protocol in our laboratory. For this purpose MEFs were isolated from E13.5 pregnant BALB/c mice and transduced using either STEMCCA RedLight or STEMCCA cMyc. Cultures were followed afterwards, as detailed in **figure 37**.

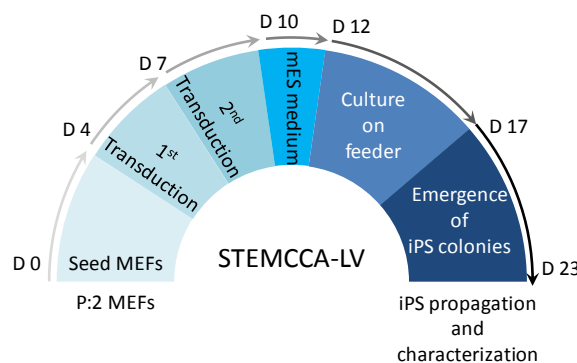


Figure 37.- Stepwise design for somatic cell reprogramming using STEMCCA LVs. Early passage MEFs were transduced with either STEMCCA RedLight or STEMCCA cMyc. Next, transduced cells were grown in ES medium and later plated onto feeder-coated plates where iPSC-like colonies arose. MEF: mouse embryo fibroblast. D, day of experiment. mES medium: murine embryonic stem cell complete medium.

Small oval or teardrop shaped colonies with well-defined smooth round edges arose in the plates 10 to 14 days after transduction. Individual colonies were isolated and expanded on feeder layers, as it was routinely done with mouse ES cell lines. When the STEMCCA RedLight LV was used, the expression of mCherry was evident in the emerged clones, **figure 38**.

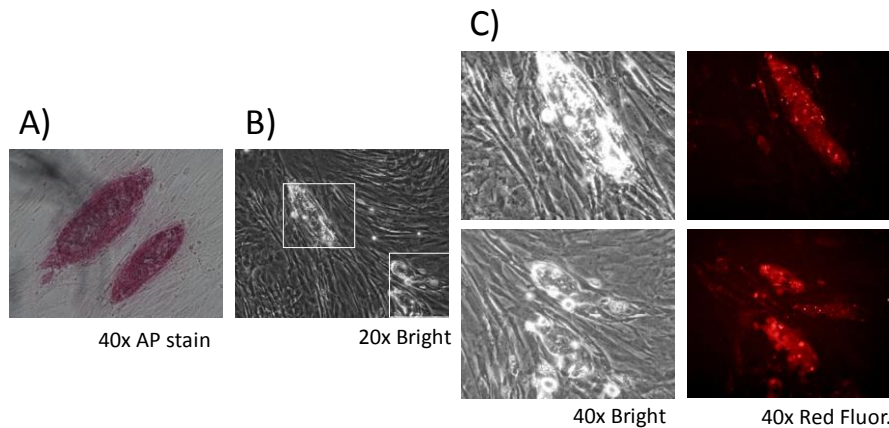


Figure 38.- mCherry positive iPSC-like colonies. Two to three weeks after STEMCCA transduction, iPSC colonies were noticeable in the cultures. **A)** AP positive colonies were confirmed in the cultures stained 17 days after STEMCCA LV delivery. **B)** Tear-shaped colonies with smooth edges emerging after STEMCCA RedLight transduction, bright field. **C)** Magnified areas revealing red fluorescence from mCherry expression. AP, alkaline phosphatase staining.

Suboptimal culture conditions or incomplete cell reprogramming can generate aberrant clones. To facilitate the work, only LV STEMCCA RedLight-iPSC like clones (henceforward referred as LV-iPSC) positive for mCherry were isolated and expanded to continue the experiments. We therefore selected candidate *bona fide* iPSC clones that were analyzed to prove expression of pluripotent markers. LV-iPSC clones were pre-screened for the expression of the characteristic surface (SSEA-1) and nuclear (OCT3/4 and NANOG) ESC markers.

After several passages on gelatin under feeder-free conditions, iPSC-like clones were resuspended and split either to be processed for RNA/DNA extraction or to be fixed for DNA content analysis by flow cytometry. Besides, we determined the STEMCCA vector copy number (VCN) per cell to allow selection of iPSC clones with a low VCN, **table 17**.

One key feature of Yamanaka's iPSC resulted from endogenous maintenance of pluripotency after silencing of the RVs ectopically expressing the reprogramming factors (Takahashi and Yamanaka, 2006). In our LV-iPSC clones, colonies were positive for red fluorescence after several passages. Then, we tried to differentiate the LV-iPSC clones *in vitro* to check whether this could affect the STEMCCA expression, **figure 39**.

The LV-iPSC clones were grown on feeder-free plates, and then let to aggregate and formed embryoid bodies (EBs) using standard protocols. The LV-iPSC clones formed EBs, morphologically indistinguishable from these generated from control mES J1 derived EBs, despite the unperturbed expression of the ectopic reprogramming factors, **figure 39**.

We observed a tendency of LV-iPSC to become tetraploid at moderate passages but not at early passages after isolation. For further experiments, we decided to thaw early passage clones and select clones with DNA content compatible with diploid chromosome content measured by flow cytometry. Despite the fact that the forced expression of *Oct3/4*, *Klf-4* (*Pou5f*) and *Sox2* could help cells to retain pluripotency, true reprogrammed cells are the ones that have gained the

ability to maintain a pluripotent undifferentiated state by themselves. Hence, given the robust expression of STEMCCA cassette we opted to remove the cassette using the Cre/LoxP system.

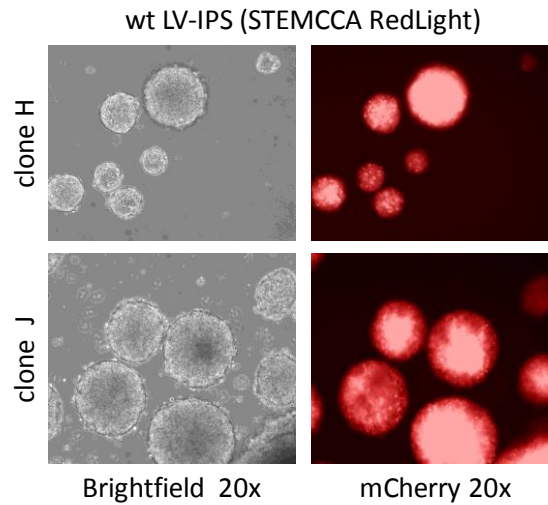


Figure 39.- Maintained expression of STEMCCA RedLight cassette upon *in vitro* differentiation. LV-iPSC clones obtained after STEMCCA RedLight transduction were grown on feeder-free gelatin coated plates for 2 passages. Cells were then resuspended and let aggregate forming embryoid bodies (EBs). Pictures show differentiated EBs after 10 days in culture retaining mCherry fluorescence.

To deliver the Cre-recombinase, we transduced the iPSC-like clones with integration deficient lentiviral vectors (IDLV) that expresses the Cre-recombinase and a GFP reporter. This IDLV was kindly provided by Tobias Maetzig and Melanie Galla (Maetzig et al., 2010) from the Hannover Medical School, Hannover, Germany. This IDLV was produced using a mutant (D64V) integrase protein (INT) which specifically prevents the integration of the circularized DNA into the host genome, while maintaining other features of INT (Yanez-Munoz et al., 2006).

To improve CRE-IDLV transduction, iPSC clones were grown for 2 passages on gelatin coated plates under feeder-free conditions. Then, trypsinized cells were resuspended and transduced for 6 h with the CRE-IDLV, and next plated on feeder-coated plates. Green cells arose in culture after 24-48 h and between one and two weeks after transduction iPSC-like colonies emerged, a high number of which were still red-fluorescent, **figure 40**.

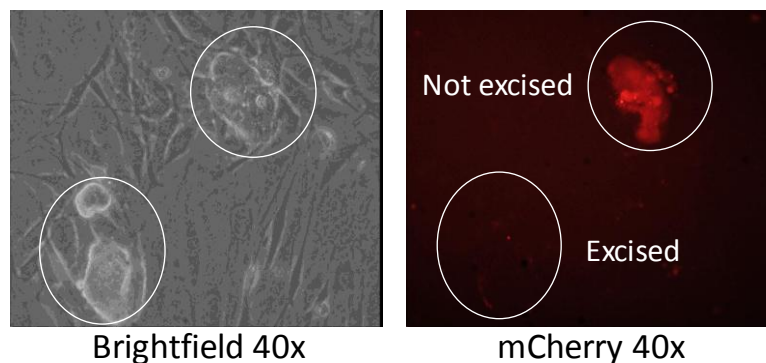


Figure 40.- Screening of LV-free iPSC-like colonies after IDLV Cre delivery. Low-copy clones were subdued to STEMCCA excision benefiting from the inclusion of Cre/LoxP system. Microscope screening of the iPSC-like colonies emerged after the treatment confirmed loss of mCherry fluorescence in some of them, suggesting successful excision of the STEMCCA RedLight cassette. IDLV, integrase defective lentiviral vector.

From a total of 229 iPSC-like colonies retrieved after IDLV-CRE delivery in separate experiments, 32 resulted negative for mCherry fluorescence. This accounts for an excision efficiency of the STEMCCA-RedLight cassette varying from 14% to 17% in different clones.

Non-red-fluorescent colonies were manually picked and expanded. In no instance, these colonies recovered the fluorescence after expansion, indicating the loss of the reprogramming cassette. Then, several colonies were confirmed to have lost the reprogramming LV by qPCR analyses using specific primers for the LTRs sequences, **table 17**, and by Southern blot, **figure 41**.

Table 17.- qPCR detection on iPSC-like clones after IDLV-Cre delivery.

Clone ID	Sample	VCN
"J"	Parental mCherry LV-iPSC (before Cre)	0.8
"J.Av"	Derived mCherry-negative iPSC clone	<0.01
"J.Bf"	Derived mCherry-negative iPSC clone	<0.01

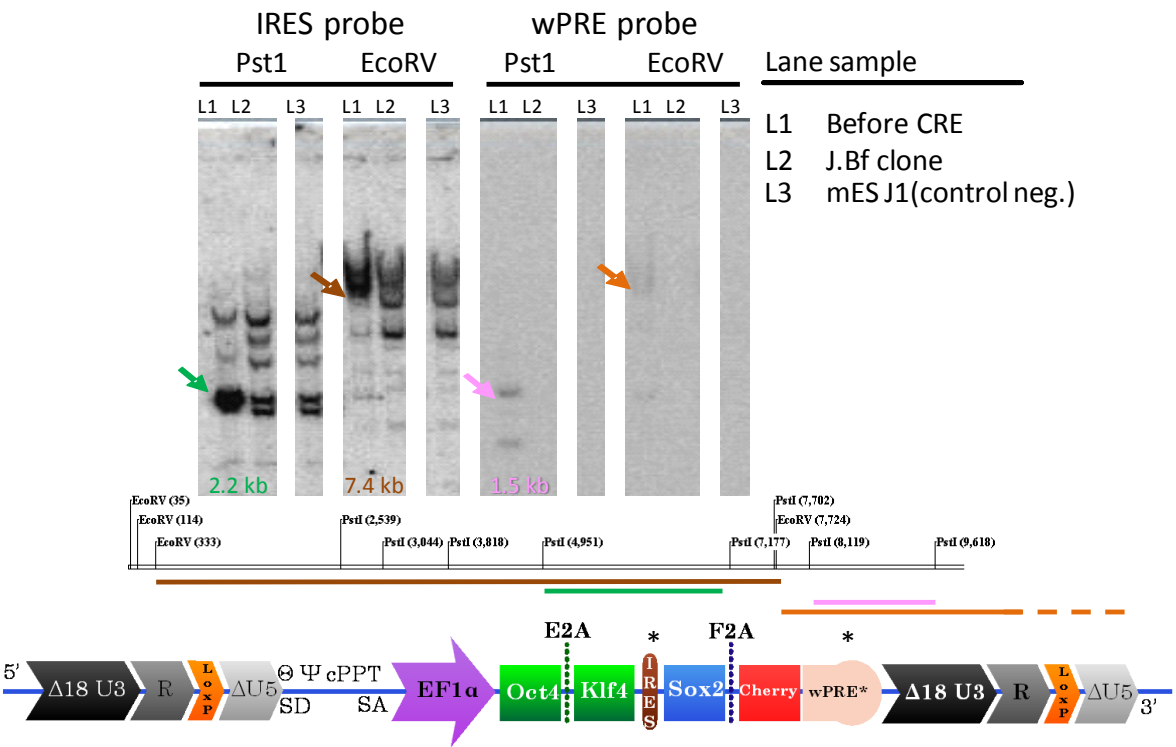


Figure 41.- Southern blot of the reprogramming LV after excision with CRE-IDLV. The genomic DNA isolated from the indicated clones growing on feeder-free plates was digested with either Pst1 or EcoRV. The digestion was resolved in electrophoresis gels and transferred to membranes prior hybridization with the probes for IRES and wPRE vector sequences. L1, parental clone (0.8 copies estimated by qPCR); L2, excised clone J.Bf; L3, mES J1 untransduced control. Color arrows indicate position of estimated restriction fragments (of the same color) detected by the probes IRES or wPRE , indicted as * in the vector scheme.

We selected the LV-free iPSC clone J.Bf as representative from the pool of excised iPSC clones for a more detailed characterization, **figure 42**. Pluripotent markers such as NANOG, OCT3/4, SSEA-1 were positive in immunohistochemical staining, **figure 42 B**.

The cytogenetic analysis of the iPSC clones showed a normal karyotype. For further detail comparative genomic hybridization (CGH) analyses were performed showing evident chromosomal unbalances in chromosomes 1, 12 and X, which was almost completely deleted, **figure 42 D**.

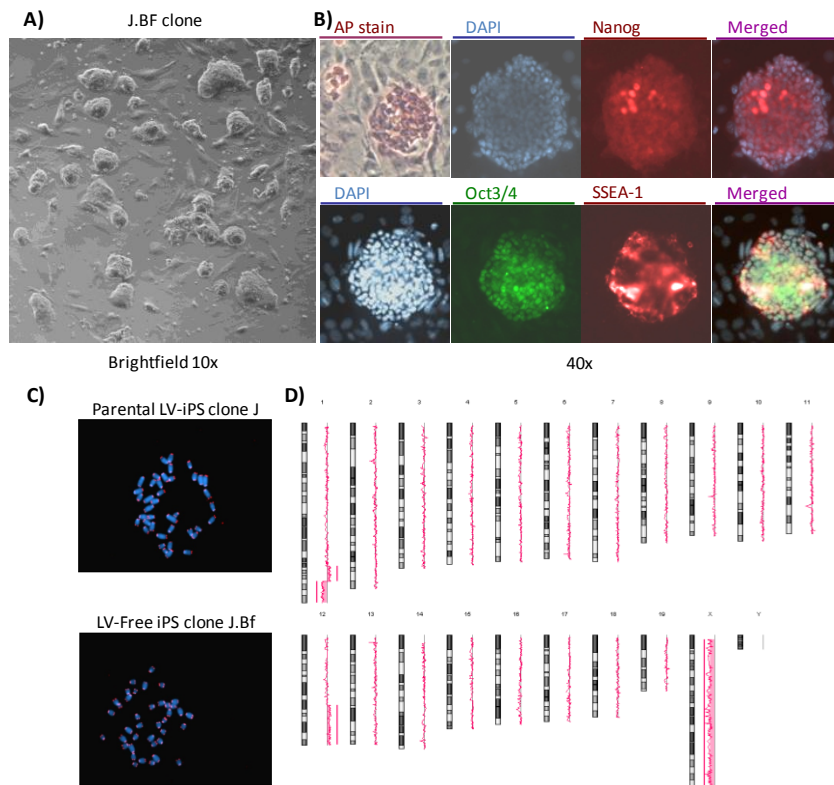


Figure 42.- Characterization of vector free iPSCs derived after CRE-IDLV delivery. The LV-free iPSC clone “J.Bf” was successfully maintained and expanded after isolation of a single colony negative for mCherry fluorescence after transient delivery of Cre recombinase. **A)** The *J.Bf* clone retained characteristic ES morphology. **B)** It was also positive for AP stain and for NANOG, OCT3/4 and SSEA1 immunohistochemical staining. **C)** Cytogenetic analyses confirmed that the parental unexcised LV-iPSC clone and the vector free derived *J.Bf* iPSC clone presented a normal karyotype. **D)** Comparative genomic hybridization (CGH) analyses only showed abnormalities in chromosomes 1, 12 and X. AP, alkaline phosphatase.

Accordingly, mRNAs from key pluripotency markers were detected in J.Bf iPSC cells using qPCR, **figure 43**. Besides, these cells were able to generate teratomas when injected intratesticularly into NSG mice. The teratomas clearly evidenced tissular structures from the three germ layers, **figure 43**, as determined by histological analyses.

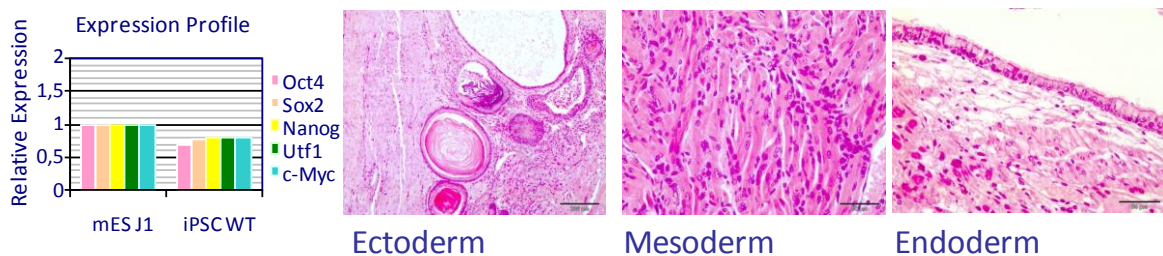


Figure 43.- Pluripotency characterization of vector-free iPSC. iPSC clone J.Bf was propagated on feeder-free conditions before RNA extraction. qPCR on the cDNA from this clone confirmed endogenous expression of Oct3/4, Sox2, Nanog, Utf-1 and c-Myc at levels close to those of mES J1 control line. Besides, J.Bf formed teratomas with structures from the three germ layers when injected into NSG mice. Pictures show keratin pearls (ectoderm), smooth muscle (mesoderm) and ciliary epithelium (endoderm).

2.1.2.- Scid MEFs resistance to cell reprogramming

Once a reference protocol for iPSC generation was set, we focused on the generation of iPSC cells from Scid MEFs. Side by side cell reprogramming experiments on Scid and wt cells were

conducted. Scid MEFs transduced with either STEMCCA RedLight or cMyc yielded a reduced number of iPSC-like colonies whose morphology were often blurred, turning in some cases into differentiated areas at early passages. This defect was corroborated by the impaired generation of iPSC-like colonies 2-3 weeks after transduction, **figure 44**.

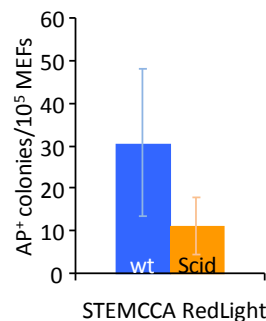


Figure 44.- Impaired generation of Scid AP positive colonies after STEMCCA delivery. Side by side transduction of wt and Scid cells with STEMCCA RedLight resulted in differential reprogramming success reflected by the number of AP positive iPSC-like colonies scored 17 days after transduction. AP, alkaline phosphatase.

We found a 4 to 7 fold decrease in the number of AP⁺ colonies yielded by Scid MEFs with respect to wt cells. No Scid iPSC line could be established from the initial pool of iPSC-like colonies, not even using the STEMCCA c-Myc vector. Clones either differentiated prematurely, stopped growth or disappeared after first passages.

Taken together our results demonstrate that we managed to produce high titer STEMCCA LVs and to set up an efficient protocol for the generation of iPSC to study Scid cell reprogramming. Using the reprogramming STEMCCA LVs, either carrying c-Myc or mCherry, we were able to generate iPSC-like colonies from early passage MEFs. Besides, vector free iPSC could be successfully isolated after Cre delivery.

Full characterization of one LV-free wt iPSC successfully demonstrated complete reprogramming sustaining the use of the STEMCCA reprogramming vectors for further experiments. Nevertheless, Scid MEFs presented a defect in the generation of iPSC through STEMCCA lentiviral reprogramming and, furthermore, we observed that the initial Scid colonies generated after STEMCCA LV transduction were unable to be propagated as iPSC lines.

2.2.- DISECTING THE REPROGRAMMING REFRACTORY PROPERTIES OF DNA-PKcs DEFICIENT FIBROBLASTS

Discovery that *Prkdc*^{scid} mutation, accounting for NHEJ defects, impaired cell reprogramming urged us to search for the reasons behind this fact that had not been reported before.

2.2.1.- Analyses of the telomere length of *Prkdc*^{scid} MEFs

One of the best-known factors affecting cell reprogramming efficiency is telomere integrity. Eroded and damaged telomeres trigger cellular responses which block cell reprogramming (Li et al., 2009; Marion et al., 2009), while previous literature was conflictive about the telomere length of Scid cells (Hande et al., 1999; Gilley et al., 2001; Goytisolo et al., 2001).

MEFs from E13.5 wt♂ x wt♀, wt♂ x Scid♀ and Scid♂ x Scid♀ crosses were isolated. Using quantitative FISH and probes for the telomere and centromere sequences. We evaluated the telomere length in wt and Scid MEF batches at the same passages used for cell reprogramming, as

shown in **figure 45**. We found elongated telomeres on early passage MEFs either homozygous or heterozygous for the *Prkdc^{scid}* mutation. These results are consistent with previous evidences already obtained by Goytisolo and colleagues (Goytisolo et al., 2001).

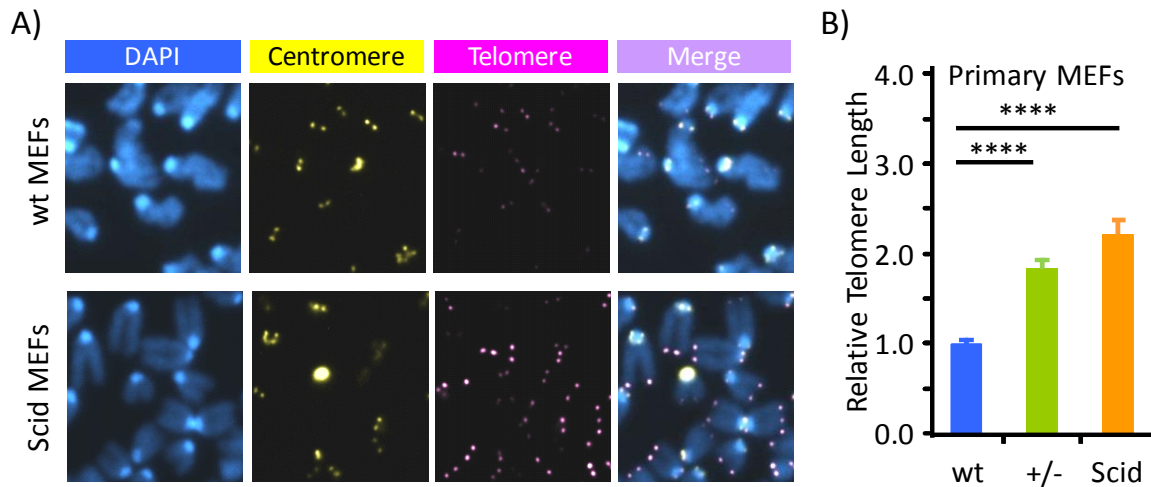


Figure 45.- Telomere length in wt and Scid MEFs. Non-transduced passage 2 wt and Scid MEFs, were analyzed to compare their telomere length. After 6 h of colcemide incubation, cells were processed for fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **A)** Amplified areas from metaphases used for the quantification. **B)** 30 metaphases were considered per sample and telomere signals were normalized using the centromere probe for comparison. Mean and standard errors are shown (**** $p < 0.0001$, T-test).

To completely discard a role of eroded telomeres in the inability of Scid MEFs to undergo cell reprogramming, we also measured the telomere length in cells transduced with STEMCCA vectors. As before, the *Prkdc^{scid}* mutation resulted in lengthened telomeres compared to wt counterparts, **figure 46**.

Although the interaction of the vector did not affect the telomere length of transduced cells at the time points studied, aberrant telomere capping may be interconnected with the drop of the reprogramming efficiency in Scid cells.

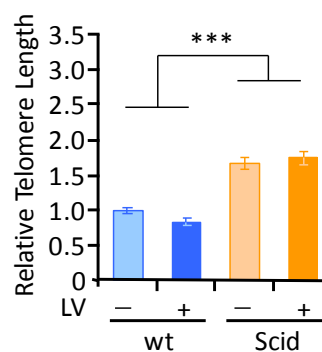


Figure 46.- STEMCCA transduction impact on telomere length. Scid cells transduced with the STEMCCA RedLight LV and their wt counter parts were processed for telomere FISH analyses. Differences between wt and Scid cultures are statistically significant (*** $p < 0.001$, T test), while no significant differences were observed due to STEMCCA LV transduction. Mean and standard errors are shown.

2.2.2.- Reprogramming-LVs promote *Prkdc^{scid}* cell proliferation

The proliferative status of cells is known to have an impact on the efficiency of cell reprogramming. To study whether short passage Scid MEFs had a proliferative disadvantage we

measured cell expansion of wt and Scid MEFs, after transduction with STEMCCA or mock transduced cells, **figure 47**. Same passage MEFs from Scid and wt mice had similar expansion profiles during the first week after mock transduction. Both cell types were stimulated to proliferate more actively after delivery of the reprogramming factors. However, only in the case of transduced Scid MEFs, significant increased expansion was found one week after transduction, **figure 47**.

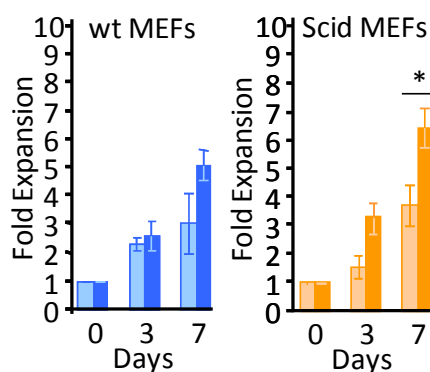


Figure 47.- Influence of the STEMCCA transduction of Wt and Scid MEFs with STEMCCA LV on cell proliferation. MEFs, either transduced or not, were cultured *in vitro* to follow cell expansion. STEMCCA increased cell numbers in both wt and Scid cultures. Differences were only significant in Scid cells 7 days after transduction (* $p < 0.1$, T-test). Clear bars correspond to mock cultures and solid bars correspond to STEMCCA transduced cells.

2.2.3.- Reprogramming-LVs efficiently transduce Scid cells

In the literature, we found reports on Scid inability to be transduced by RVs (Daniel et al., 2004) and others reporting on the contrary (Baekelandt et al., 2000). The handicapped cell reprogramming of *Prkdc*^{scid} cells could have been directly related to a decreased efficacy of the LVs to transduce these cells. To understand whether *Prkdc*^{scid} mutation conferred a differential susceptibility to Scid cells to interact, express or integrate the LV into their genome, we evaluated the expression of the mCherry protein encoded in the STEMCCA RedLight cassette using flow cytometry analyses in both wt and Scid transduced MEFs, 3 and 7 days post transduction (dpt), **figure 48**.

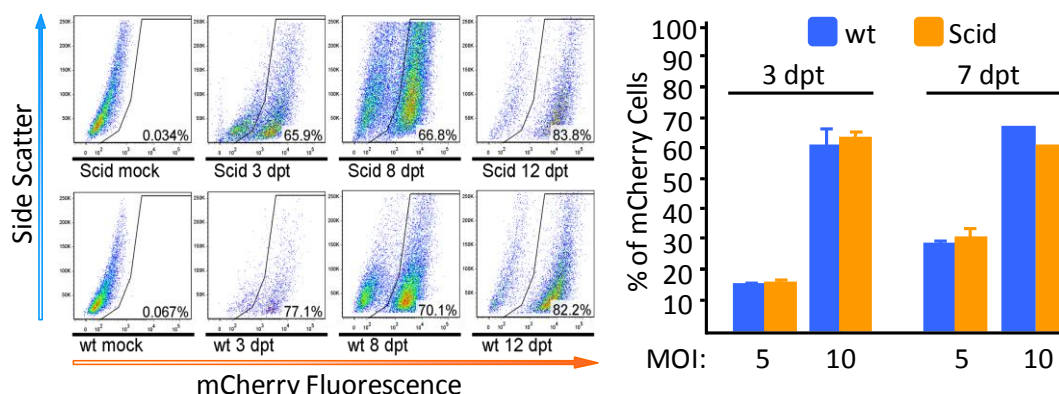


Figure 48.- Scid susceptibility to STEMCCA transduction. The analysis of mCherry fluorescence was used to determine susceptibility of wt and *Prkdc*^{scid} MEFs to STEMCCA RedLight transduction. Similar percentages of mCherry positive cells were obtained in both cell types. **Left**, representative flow cytometry analyses of mCherry transduced cells. **Right**, mean and SEM from different transduction experiments with low (5) and moderate (10) MOI, at 3 and 7 dpt. MOI, multiplicity of infection; dpt, days post transduction.

Using the same MOI, wt and Scid MEFs achieved similar percentages of mCherry positive cells shortly after transduction. The same observations were obtained at 7 dpt, indicating that a decreased transduction susceptibility should not account for the impaired reprogramming ability of Scid cells.

2.2.4.- *Prkdc*^{scid} MEFs subjected to STEMCCA LV cell reprogramming show an increase senescent phenotype

It has been previously shown that cell reprogramming induces DNA damage. Inability of Scid MEFs to resolve this damage can result in persistent DDR signaling stress in the cells.

Ten days after transduction with the STEMCCA LV we tested the expression of *tp53*, *p21/CIP1*, *p15/INK^{4a}*, *p16/INK^{4a}* mRNAs because they are key factors of the DDR involved in cell cycle progression. In **figure 49**, increased levels of *p16/INK^{4a}* expression are shown in *Prkdc*^{scid} cells undergoing cell reprogramming, which may induce a senescent status incompatible with the reprogramming process (Li et al., 2009). These results are consistent with an increase of SA-β-Gal staining, characteristic marker of cell senescence, **figure 49**.

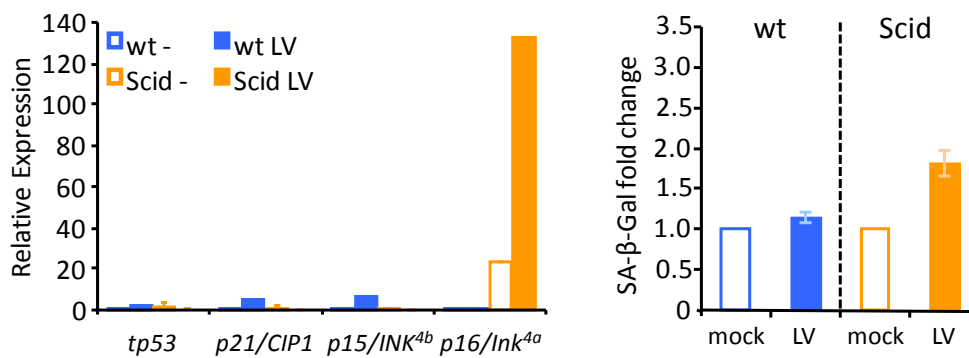


Figure 49.- STEMCCA transduction effects on cell senescence. Left, expression of several key factors (*tp53*, *p21/CIP1*, *p15/INK^{4b}* and *p16/INK^{4a}*) tested in the mRNA isolated from wt and Scid MEFs 10 dpt. Right, in parallel we performed senescence associated β galactosidase staining (SA-β-Gal) to discern whether STEMCCA transduction had an effect on the senescence status of Scid MEFs.

Taken together, the data in this section show that the differential telomere length present in wt and Scid before cell reprogramming were not significantly changed due to LV transduction. Besides, the short Scid and wt MEFs employed in these experiments had the similar proliferation rates and transduction susceptibility, indicating that none of the mentioned factors could account for the reduced reprogramming efficiency of Scid cells, observed after the transduction of with the STEMCCA LV. However, increased levels of *p16/INK^{4a}* mRNA, coincident with a moderate increase in SA-B-Gal staining, was found in Scid cells undergoing LV cell reprogramming, indicating that this event could, at least in part, account for the inability of Scid Mefs to be reprogrammed with the STEMCCA LV.

2.3.- REPROGRAMMING TRANSPOSONS FACILITATE THE GENERATION OF DNA-PKcs DEFICIENT iPSCs WITH A CHARACTERISTIC RADIOSENSITIVE PHENOTYPE

In an attempt to overcome the reprogramming defect of the *Prkdc*^{scid} cells, we evaluated non-viral methods with a high reprogramming efficiency. We chose to use T2/OSKM (Kues et al., 2012), a novel Sleeping Beauty (SB) transposon engineered in the laboratory of Zoltan Ivics, which coupled with the hyperactive transposase mutant (SB100X), presented a high reprogramming performance.

2.3.1.- Optimizing nucleofection in *Prkdc*^{Scid} MEFs

The use T2/OSKM non-viral technology required from physical or chemical methods to deliver DNA into the target cell. We compared different transfection technologies and conditions in order to optimize DNA delivery into our target Scid MEFs. Using standard reporter systems we evaluated delivery, survival and proliferation of treated cells 96 h after transduction, **figure 50**.

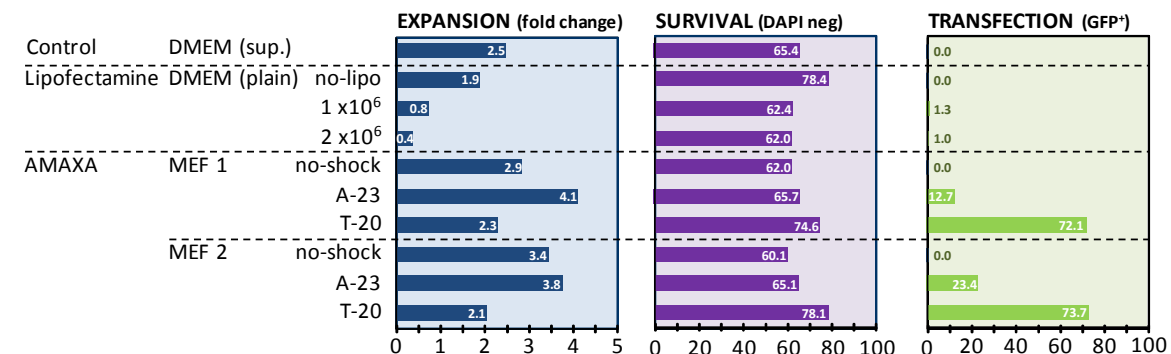


Figure 50.- Optimization of plasmid delivery into Scid MEFs. A set of different transfection methods and conditions were tested using a GFP reporter plasmid alone. We considered the effect of the transfection on the growth (blue), toxicity (purple) and gene transfer efficiency (green) in Scid MEFs 96 h after plasmid delivery.

A nucleofection protocol by AMAXA was selected as standard delivery method. The best condition to transfect *Prkdc*^{Scid} cells consisted of the use of the T-20 program and the MEF 2 solution, according to AMAXA specifications.

2.3.2.- Reprogramming transposons efficiently generate wt and Scid iPSC colonies

In our experiments, 2x10⁶ cells were nucleofected with the T2/OSKM reprogramming SB transposon plus SB100X hyperactive transposase to generate colonies of iPSC-like cells following the scheme indicated in **figure 51**.

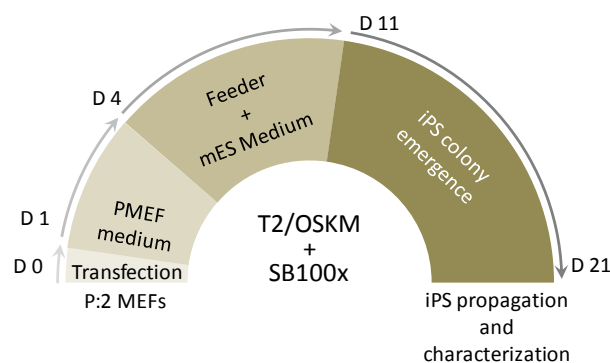


Figure 51.- Reprogramming strategy using Sleeping Beauty transposons. We set a reprogramming protocol for cell reprogramming with optimized SB transposon/transposase system.

iPSC-like colonies, positive for AP staining and resembling ESC morphology, arose between 2 to 3 weeks after transfection. Quantification of AP⁺ colonies showed a marked increase in the reprogramming efficiency obtained in these experiments compared to cell reprogramming with LVs, **figure 52**.

In contrast to previous LV reprogramming experiments, colonies isolated from nucleofected

cultures could be propagated in ESC medium on feeder layers, without loss of their induced undifferentiated morphology. The iPSC clones isolated using the SB transposon system were name as Tn-iPSC.

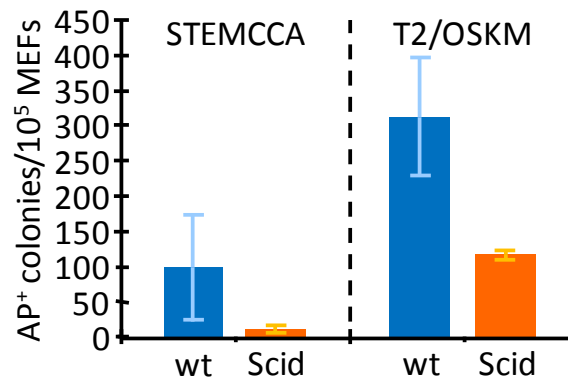


Figure 52.- Reprogramming efficiency of wt and *Prkdc*^{Scid} MEFs using Sleeping Beauty transposon and STEMCCA-cMyc LV systems. The figure shows the number of AP positive colonies generated by the STEMCCA c-Myc LV and T2/OSKM SB transposon. AP, alkaline phosphatase. Mean and standard errors are shown.

2.3.3.- Differences in the molecular events induced by STEMCCA LV and T2/OSKM in *Prkdc*^{Scid} cells

The successful generation of Scid iPSC-like clones using T2/OSKM made us search for differences in the molecular events induced during the reprogramming with the STEMCCA LV and the SB transposon. Telomere length was determined in nucleofected cells by quantitative FISH at the same time after delivery of the reprogramming cassette used for reprogramming LVs, **figure 53**. No significant differences were found between T2/OSKM transfected and non-transfected MEFs, independently of the genetic background.

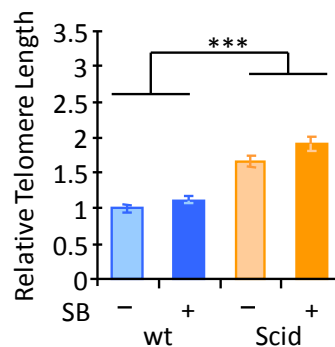


Figure 53.- Effect of reprogramming Sleeping Beauty transposon on telomere length of wt and *Prkdc*^{Scid} MEFs. Cells were transfected with T2/OSKM + SB100x and were processed for telomere FISH analyses at 10 days post transfection. Differences were found between wt and Scid cultures (***) p<0.001, T test). However, no significant differences were observed between transfected and non-transfected cells. Mean and standard errors are shown.

To compare the transfection efficiency in wt to DNA-PKcs deficient cells, we calculated the VCN in the Tn-iPSC clones derived from wt and *Prkdc*^{Scid} origin, **table 17**. In all instances, the number of integrated SB transposons per cell was between 1 and 3.

When mRNA levels of *tp53*, *p21/CIP1*, *p15/INK^{4a}*, *p16/INK^{4b}* were examined 10 days after nucleofection of the reprogramming SB transposon, we found that in this case no induction in the expression of *p16/INK^{4a}* could be noted, **figure 54**.

Table 17.- Estimated qPCR vector copy number

Clone ID	Background	Vector	Estimated copies	qPCR VCN
Tn-iPSC 01.02	Wt	T2/OSKM	1	0.79
Tn-iPSC 01.10	Wt	T2/OSKM	1	0.87
Tn-iPSC 03.32	<i>Prkdc</i> ^{Scid}	T2/OSKM	3	3.39
Tn-iPSC 03.64	<i>Prkdc</i> ^{Scid}	T2/OSKM	1	0.38
Tn-iPSC 01.72	<i>Prkdc</i> ^{Scid}	T2/OSKM	1	0.88

Similarly, *Prkdc*^{Scid} cells transfected with T2/OSKM did not show any tendency to increase SA-β-Gal staining, **figure 54**.

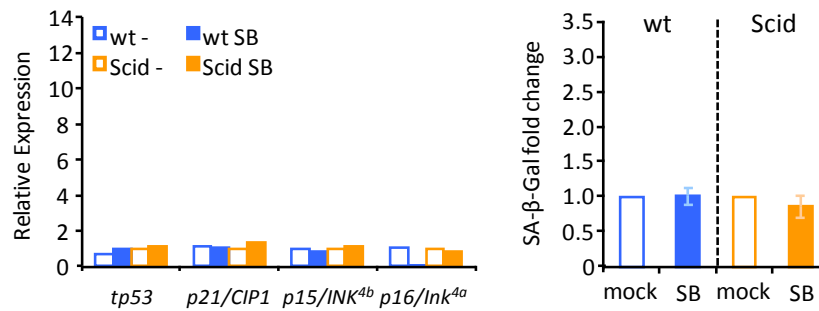


Figure 54.- Absence of Senescence activation in Scid cells reprogrammed with the T2/OSKM SB transposon. Left, mRNA was isolated from wt and Scid MEFS, 10 days after nucleofection. We tested expression of: Tp53, p21/CIP1, p15/INK^{4b} and p16/INK^{4a}. Right, in parallel we performed senescence associated β galactosidase staining (SA-β-Gal) to discern whether the nucleofection of the reprogramming SB and the SB100x had an effect on the Scid MEFs.

2.3.4.- Scid Tn-iPSC match pluripotency standards

From these experiments, more than 150 Tn-iPSC clones were isolated, including wt and Scid Tn-iPSC colonies. We selected some clones which were expanded and characterized to verify the full reprogramming of these cells. Wt and Scid Tn-iPSC clones were indistinguishable from each other attending to their morphology, flow cytometry detection of SSEA-1 and chromosomal content, **figure 55**.

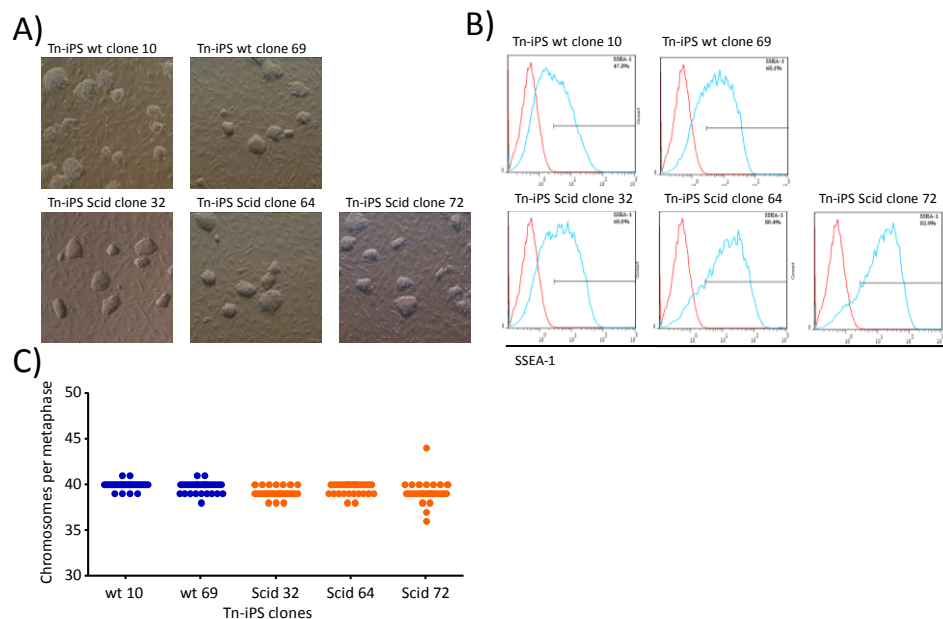


Figure 55- Characteristics of DNA-PKcs deficient iPSC clones generated with reprogramming SB transposons. Both wt and Scid Tn-iPSC clones had **A)** an ES-like morphology, **B)** positive SSEA-1 expression confirmed by flow cytometry and, **C)** diploid chromosome content.

Immunohistochemical detection of either nuclear (NANOG, OCT3/4) or surface (SSEA-1) ESC markers and expression of endogenous ESC factors were observed in our iPSCs, evidencing the pluripotency of both wt and Scid Tn-iPSC clones, **figure 56 A and B**.

Besides, when Scid Tn-iPSC clones were inoculated into NSG mice, they were able to generate teratomas containing cells differentiated into the three germ layers, **figure 56 C**.

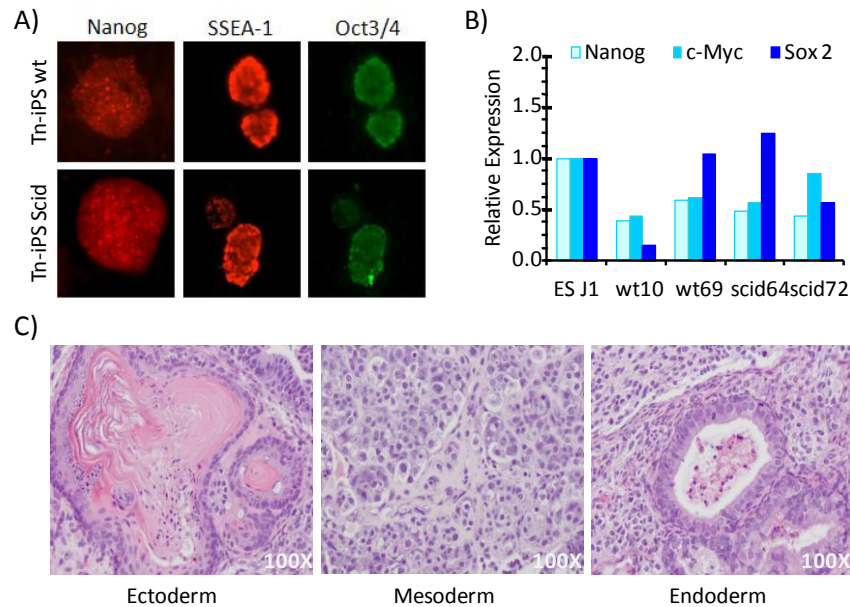


Figure 56.- Confirmation of pluripotency of Tn-iPSC lines. Wt and Scid Tn-iPSC cells were positive for pluripotency hallmark features. **A)** Immunohistochemistry confirmed expression of NANOG, OCT3/4 and SSEA-1. **B)** RT-PCR analyses on Tn-iPSC confirmed expression of endogenous *Nanog*, *c-Myc* and *Sox2* in either wt or Scid Tn-iPSC clones. **C)** Scid Tn-iPSC lines were able to form *bona fide* teratomas when injected into NSG mice. Pictures show keratin formations (ectoderm), immature cartilage (mesoderm) and *ciliar* monostratified epithelium (endoderm) from the same Scid Tn-iPSC line teratoma.

2.3.5.- *Prkdc*^{scid} iPSCs exhibit a radiosensitive phenotype characteristic of NHEJ deficient cells

The original genotype of parental *Prkdc*^{scid} MEFs was confirmed in Tn-iPSC lines using diagnostic restriction analyses of the reported mutation in *Prkdc* sequence, **figure 57 A**.

Next, MEFs and Tn-iPSCs were subjected to increasing doses of X-Rays to verify whether *Prkdc*^{scid} cells maintain the characteristic radiosensitivity. As shown in **figure 57 B**, we could demonstrate the IR hypersensitive phenotype of *Prkdc*^{scid} Tn-iPSCs, as compared to the wt counterparts.

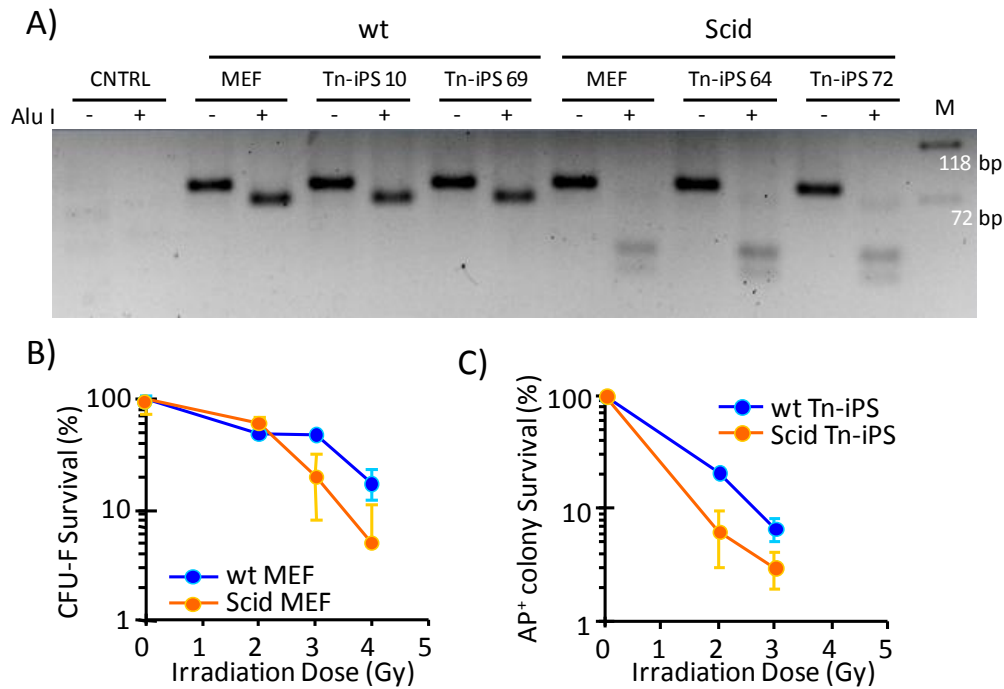


Figure 57.- Scid Tn-iPSC conserves parental *Prkdc* mutation resulting in a radiosensitive phenotype. A) The original *Prkdc*^{Scid} mutation was confirmed by Alu I digestion of the specific *prkdc* loci in the Tn-iPSC generated and the parental MEFs. **B)** Radiosensitivity of parental Scid MEFs compared to the wt MEFs. **C)** Hypersensitivity to IR in DNA-PKcs deficient Tn-iPSCs as compared to wt Tn-iPSCs.

To conclude, these results show the generation of DNA-PKcs deficient iPSC cells when the highly efficient SB transposon/transposase system was used. Scid and wt Tn-iPSC were indistinguishable in morphology, expression of pluripotency markers or chromosome count, and were able to generate teratomas into NSG mice, which clearly demonstrated the pluripotent capacity of the DNA-PKcs deficient iPSCs. Moreover, Scid Tn-iPSC, exposed to IR, displayed the hypersensitive phenotype characteristic of NHEJ deficient cells.

VII.- DISCUSSION

1.- PRECLINICAL EVALUATION OF FANCA-LV ON A MOUSE MODEL OF FA-A

Despite the increasing interest for the development of standard methods to predict genotoxic risks in the field of gene therapy, so far, only a limited consensus has been achieved in this respect. Herein we present the use of a gene therapy mouse model for FANCA deficiency and exploit it for the preclinical evaluation of the efficacy and safety of a LV to be used in clinical trials for FA-A patients.

We were able to produce high-titer supernatants ($1-3 \times 10^8$ TU/ml) of FANCA-LV pseudotyped with the vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G), which is a fusogenic protein that confers to the vector particles high transduction efficiency in CD34⁺ cells. Hence, an efficient transduction of *Fanca*^{-/-} mouse lin⁻ BM cells was achieved even using a short single-shot protocol, which reduces the HSCs damage.

As it has been already shown, extensive culture harms HSCs and thus impairs their engraftment capacity and pluripotency even in the case of healthy cells (Selleri et al., 1999; Allsopp et al., 2001; Thornley et al., 2001; Naka et al., 2008; Yahata et al., 2011). Particularly, benefits from minimal manipulation are utterly relevant for the handling of FA HSCs due to the deleterious impact that *ex vivo* culture stresses have on FA cells (Martinez et al., 2008; Rani et al., 2008; Ceccaldi et al., 2012

). We only modified our short transduction protocol to allow comparison of FANCA-LV with a γ -RV with known genotoxic potential. The retroviral integrase lacks the ability to surpass the nuclear membrane of cells during interphase. Hence, its transduction potential depends directly on the proliferative status of the target cells, constraining vector integration to mitotic cells. Therefore, a 48 h pre-stimulation followed by 2 rounds of γ -RV transduction was used to achieve a similar transduction than the one obtained with the LVs; thus, compensating the poor targeting of resting cells and the lower titers achieved with the EGFP-RV batches. The use of up to 48 h of *ex vivo* transduction only resulted in a modest stress for mouse *Fanca*^{-/-} HSCs, as deduced from the high level of chimerism observed in transplanted recipients (**figure 18**). Taking into account the modest FA phenotype exhibited by *Fanca*^{-/-} mice (Cheng et al., 2000), stronger deleterious effects could, however, be predicted for human FA HSCs subjected to long transduction protocols.

Consistent with previous observations, the characteristic hypersensitivity of *Fanca*^{-/-} hematopoietic progenitors to DNA cross linking agents, such as MMC, was significantly reverted after transduction with the FANCA-LV (Gonzalez-Murillo et al., 2010). Besides, the vector doses tested resulted in no significant toxicity to the content of hematopoietic progenitors evaluated by the number of hematopoietic colonies generated in methylcellulose cultures (**figure 15**).

Similarly, good engraftments and survival rates were achieved in most of the transplanted *Fanca*^{-/-} recipients subjected to our gene therapy protocol (**figure 17** and **19**). The good repopulation of the hematopoietic tissues of recipient mice transplanted with gene corrected cells is indeed favored by the conditioning regimen, which consisted of a potentially lethal IR dose causing leukopenia and BM aplasia in the recipient mice. This is a controversial point for upcoming gene therapy trials for FA patients. Despite the general consensus about the benefits of mild or severe conditioning on HSC transplantation, the risk of triggering deleterious malignancies in FA patients due to their impaired ability to repair DNA damage is a major concern. However, because of the risks of graft failure in absence of any conditioning, some experts consider convenient to apply mild conditioning prior to cell infusion (Liu et al., 1999; Kelly et al., 2007).

Besides, conditioning regimens have been successfully applied in previous gene therapy trials (Cartier et al., 2009; Cavazzana-Calvo et al., 2010; Cartier et al., 2012; Aiuti et al., 2013; Biffi et al., 2013). However, it is noteworthy that none of these disorders are associated with DNA repair defects.

Records of chimerism in PB from primary and secondary recipients showed stable engraftment in the first ones and a faint drop in the second ones, in both LV-complemented and RV-marked transduced cohorts (**figure 18**). This could be explained by combined susceptibility to ageing of HSCs during their long-term engraftment in recipient mice and an affected capacity of *Fanca*^{-/-} hematopoietic niche to host donor cells. Undoubtedly, further investigation on the cells supporting HSC niche is fundamental in FA. The increased numbers of CFCs observed in the BM from either primary or secondary *Fanca*^{-/-} recipients subjected to gene therapy suggest that defects in the self-maintenance of FA HSC mainly reside in the HSC population itself, and that this is corrected after the gene complementation (**figure 20**).

The presence of all types of mature cells in the PB of transplanted animals was evident in both primary and secondary recipients (**figure 19**). While analyses on RV-marked cohorts showed considerable differences among individuals and time points, the absence of hematological skewing in *FANCA*-LV corrected cohorts reinforces the safety associated with the use of this vector for FA gene therapy.

Notably, when BM cells from gene therapy treated mice were seeded in methylcellulose plates and exposed to increasing doses of MMC, a significant increase in their tolerance to MMC was documented. Opposedly, CFCs obtained from mock or *EGFP*-RV transplanted recipients retained their characteristic FA hypersensitivity to this drug (**figure 24**). Together, these experiments support the efficiency of the *FANCA*-LV to correct the function of *Fanca*^{-/-} HSCs. Accordingly, these results highlight the stability of the therapeutic provirus, whose function is not lost or silenced even after stressing LV-transduced cells through serial BMT.

Integrative gene therapy results in life-long modification of the patients cells. Thus, safety concerns imply the necessity of verifying the vector identity and function over long periods of time. To confirm that the 3rd generation SIN *FANCA*-LV was unable to generate replication competent lentivirus (RCLs), the presence of newly generated vector particles was tested by ELISA detection of HIV p-24 proteins. As expected, no particles were detected in the serum of transplanted animals. Besides, human PB lymphocytes were transduced with the *FANCA*-LV and the presence of p-24 protein content was analysed. After one week, the levels of p-24 were undetectable and did not increase with time (**figure 21**). Those results corroborate the safety design of the *FANCA*-LV that prevents the generation of *de novo* infective particles.

Furthermore, bio-distribution of the infused therapeutic cells was tracked in recipients long-term after transplant. Genomic DNA isolated from different organs was used for specific PCR amplification of *FANCA*-LV sequences. We could readily detect persistence of marked transduced cells in hematopoietic tissues. In other non-hematopoietic tissues, such as brain and gonads, no significant signal from LV sequences could be detected (**figure 23**). The lack of marked cells in the gonads, in either male or female recipients transplanted with *FANCA*-LV transduced cells, indicates that transduced hematopoietic cells do not contribute to gametogenesis. Likewise, this discards the possibility that residual amounts of the LV, accompanying the infused cells after washing, could overcome complement inactivation and target tissues such as gonads or brain. The detection of low amounts of the LV provirus in certain tissues such as the liver is explained by the presence of blood cells in this highly irrigated organ (**figure 18**). Therefore, we can conclude from

these experiments that gene therapy based on the infusion of gene corrected-HSCs was confined to the hematopoietic lineage, reinforcing the safety of the *FANCA*-LV vector.

There is a general concern in the field of integrative gene therapy about secondary effects that could arise from individual integrations altering nearby genes, either by affecting regulatory sequences of the cell genome or disrupting the codifying frame itself. Current insertion site (IS) analysis, based on the amplification and sequencing of genomic loci surrounding the integrated provirus, facilitated a thorough description of the IS repertoire. Currently, next generation sequencing (NGS) platforms facilitate the determination of thousands of IS, but the huge amount of data generated in these analyses need to be translatable into biological information with relevant safety implications. The process of amplification, quality control, filtering and data handling are constantly being updated. We chose to use LAM-PCR because, despite inefficient amplification of IS located either too close or too far from the restriction motifs, this procedure has a solid overall performance and is well optimized for limited blood samples. Apart from describing the insertion profile of a given integrative vector, LAM-PCR coupled to NGS techniques can semi-quantitatively report on the contribution of each individual IS between all counterpart sequences read in parallel, which makes it highly suitable for the follow up of fluctuating clonal populations.

According to published data, γ -RVs have a tendency to integrate near the transcription start site (TSS) of genes (Montini et al., 2006; Cattoglio et al., 2007; Montini et al., 2009; Cattoglio et al., 2010a; Cattoglio et al., 2010b), while LVs predominantly integrate in codifying genomic regions, but do not preferentially target sequences around TS. Furthermore, LIS are found fairly interspersed along gene codifying regions (Laufs et al., 2006; Gonzalez-Murillo et al., 2008; Cattoglio et al., 2010a; Cattoglio et al., 2010b; Biffi et al., 2011). These observations are consistent with the idea that major risks of cell transformation are markedly increased in the case of γ -RV with respect to LV, because of the transactivation of oncogenes or cell-cycle activators surrounding RIS (Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; ESGCT, 2006; Deichmann et al., 2007; Hacein-Bey-Abina et al., 2008).

There is a vast experience in preclinical and clinical settings showing the safety associated to the use of LVs (Laufs et al., 2006; Gonzalez-Murillo et al., 2008; Mantovani et al., 2009; Maetzig et al., 2011; Ronen et al., 2011; Cartier et al., 2012; Cesana et al., 2012; Frecha et al., 2012; Scaramuzza et al., 2012; Aiuti et al., 2013; Biffi et al., 2013). Hitherto, only in one case it has been reported LV-mediated transformation in wt mouse cells by the insertion of a LV within a tumor suppressor gene. In this case, leukemia-like transformation was demonstrated *in vivo* in a mouse with a SIN-LV interfering the expression of *Ebf1*, a key regulator of B-cell differentiation (Heckl et al., 2012). In a human trial for β -Thalassemia a dominant clone arose as a result of the specific insertion of the provirus within 3' regulatory sequences of *HGMA2*, impeding the post-transcriptional control of this gene, with a role in adipogenesis and mesenchymal differentiation (Cavazzana-Calvo et al., 2010). Despite the skewed clonality, recently, it has been reported that the patient affected by the *HGMA2* clone maintains normalized hematological values and continues transfusion independency 6 years after the gene therapy treatment (Leboulch, 2013).

Several differences in the insertion profile of RIS and LIS in *Fanca*^{-/-} hematopoietic repopulation were noted in our experiments. Recipients of *EGFP*-RV marked cells yielded an oligoclonal repopulation pattern, as deduced from the very limited repertoire of integrations resolved by electrophoresis of the LAM-PCR products compared to the therapeutic LV. Besides, RIS distribution showed a strong representation of a few overcoming clones which behaved as

having proliferative advantages (**figures 26, 28, 31 and 37**). This was clearly reflected in analyses of the semi-quantitative contribution of RIS in primary and secondary recipients, which exhibited a strong selection for certain integrations resulting in a chromosomal distribution afar from our random *in silico* control. Oppositely, recipients transplanted with *FANCA*-LV transduced cells displayed a highly polyclonal repopulation repertoire (**figure 25**). The chromosomal distribution of LIS accommodates well with a random IS dataset generated *in silico*, without the strong IS skewing seen in the *EGFP*-RV RIS in primary and secondary recipients (**figure 27**). Turnover of the LIS over time and across the BMT was followed to evidence continuous contribution of newly arisen clones (**figures 31, 32-36**).

From these results, it is remarkable that the *Fanca*^{-/-} serial BMT model allowed the identification of overcoming γ -RV clones, leading presumably to malignification (Hahn and Weinberg, 2002; Modlich et al., 2005), in which clonal dominance constitutes a doorstep of cell transformation (Fehse and Roeder, 2008). Furthermore, in this FA mouse model, the therapeutic integration of *FANCA*-LV in the genome of *Fanca*^{-/-} cells did not trigger clonal dominance and rather displayed a polyclonal repopulating profile.

Although chromosomal distribution of LIS mainly falls into a random profile (**figure 27**), a more detailed study of the *FANCA*-LV insertion profile defined the presence of clusters of Common Insertion Sites (CIS) as a result of the co-integration of a number of LIS in statistical relevant proximity. This may either resemble availability of exposed transcriptional active *loci* at the moment of the provirus integration or reflect sequence-specific interactions between features from the vector and the host genome.

Besides of the systematic description of the integrome of *FANCA*-LV in this model, LAM-PCR studies can provide relevant insights on clonal dynamics of stably corrected HSCs. This is based on the semi-quantitative output of LAM-PCR coupled to NGS technologies, which provides read counts for the different amplicons. We used this estimation to extrapolate the contribution of individual LIS to the pool of retrieved clones. The study of sequential PB and BM samples allowed us to perform analyses of the clonal dynamics, and therefore of the potential skewing and domination processes on the recipients' hematopoiesis after gene therapy. To maximize the informative potential of such IS analysis, several transplantation experiments differing in the BMT methodology were undertaken. On one hand, periodic sampling and mouse to mouse BMT facilitates the follow up of clonal variance. On the other hand, BMT performed with pooled BM samples strongly selects the fittest clones among several BM donors, thus increasing the chances to display dominance or leukemogenic episodes through the propagation of advantageous clones among several recipients.

The *Fanca*^{-/-} mouse model chosen showed a high sensitivity for RV insertional genotoxicity, measured by clonal dominance. One hundred and eighteen different RIS could be sequenced in primary *EGFP*-RV treated mice and 62 in secondary RV-recipients. Significantly, only one third were novel RIS. With the therapeutic LV we mapped 7,513 LIS in primary *FANCA*-LV treated mice and 1,369 LIS in their secondary recipients, which served to evidence a healthy clonal repopulation across the BMT (**table 16**). Besides a high percentage of LIS present in *FANCA*-LV primary recipient were never detected again in secondary recipients receiving their BM (**figure 30**). Deeper characterization of clonal fluctuation was achieved by monitoring contribution of individual IS in blood samples at different time points. The display of top 10 LIS contributing to PB clearly reflects the loss and gain of clones over time. This implies clear clonal turnover of the HSC giving rise to hematopoiesis in *FANCA*-LV treated animals, being this feature cornerstone for a

healthy hematopoiesis.

Transplantation of pooled BM was intended to select the fittest clones in the primary recipients and this idea easily matches with the strong clonal selection seen in the BM of secondary *EGFP-RV* treated recipients. Remarkably, the *EGFP-RV* marked cells resulted in strong selection and overcoming of integrations close to *Evi1*, a well-known target for γ -RV vectors that has been proven to drive retroviral mediated leukemogenesis (Modlich et al., 2006; Montini et al., 2006; Kustikova et al., 2007; Modlich et al., 2008; Montini et al., 2009). Again, these results support the susceptibility of the chosen model to amplify and sense even proliferative advantages. However, pooled BMT of *FANCA-LV* did not result in such clonal selection or progression to oligoclonality and although some top 10 clones were repeatedly found between individuals, none of them overcome the others repeatedly in several animals. Besides when dominance (>20% contribution) was found, it rarely was due to a single dominant clone. From the list of the genes targeted in the 31 dominant clones listed in **supplemental table S3**, only 3 were listed as CIS in the RCGD. Moreover, the majority of the clones that showed frequencies above 20% were transient.

We have focused on the effects of the transduction with the *FANCA-LV* vector on viability, stemness, engraftment and clonal evolution of HSCs. Nevertheless, many other aspects derived from the *ex vivo* culture may also affect to FA HSCs with an impact on the efficiency and the safety of the gene therapy approach. In any case, the results condensed in this memory predict a very low genotoxic impact associated to the use of the therapeutic *FANCA-LV*. Because of the sensitivity and informative value of clonal analyses, a close follow up of the corrected cells, as is routinely performed in clinical gene therapy trials will also be conducted in patients undergoing *FANCA-LV* gene therapy.

Taken together the results of this first section of the thesis, we can conclude that short *ex vivo* transduction of FA hematopoietic progenitors with the *FANCA-LV* corrects *Fanca*^{-/-} lin⁻ BM cells. Thus, the corrected FA HSCs were able to generate hematopoietic colonies *in vitro* and efficiently engraft *Fanca*^{-/-} recipients for long-term after serial BMT. A clear and sustained phenotypic correction of MMC hypersensitivity, characteristic of FA cells, was achieved in all our experiments. Under a toxicological point of view, the *Fanca*^{-/-} animals receiving *FANCA-LV* treated cells did not show any symptoms of toxicity after the infusion of the corrected cells and, in no case, dysplasia associated with a LV insertion was observed. The analyses of the insertion sites in repopulating cells harboring *EGFP-RV* or *FANCA-LV* provirus served to demonstrate both the healthy and polyclonal repopulation of animals engrafted with the *FANCA-LV* transduced cells. Thus, efficacy and safety data compiled in this section of the thesis further sustains the reliability of this vector to enter into clinical investigation in human FA-A patients.

2.- IMPAIRED CELL REPROGRAMMING OF CELLS WITH DEFECTIVE NHEJ DUE TO SCID MUTATION

Herein, we report the outcomes from the use of improved LVs (Sommer et al., 2009; Somers et al., 2010; Sommer et al., 2010) and non-viral SB transposons (Mates et al., 2009; Kues et al., 2012; Muenthaisong et al., 2012) vectors for the generation of DNA-PKcs deficient iPSCs. Additionally, we have provided evidence showing for the first time the relevance of NHEJ in cell reprogramming.

Our first experiments showed marked differences in the number of AP positive iPSC-like clones after transduction/transfection of Scid cells with respect to numbers found in wt cells

(figure 44). Among the platforms assayed, T2/OSKM SB transposon outstand as the most powerful reprogramming tool followed by STEMCCA cMyc LV and then the STEMCCA RedLight LV, with reprogramming efficiencies of 0.0035, 0.001 and 0.0003 in wt MEFs, respectively (figures 45 and 53). Nevertheless, the moderate STEMCCA RedLight reprogramming efficiency was sufficient to isolate and expand iPSC lines from the wt cells. The STEMCCA RedLight design allowed us to easily follow transgene expression, measuring the mCherry fluorescence, and also to retrieve the STEMCCA cassette from the iPSCs, taking advantage of the flanking loxP sites present in both LTRs. This reprogramming LV thus facilitated the generation of *bona fide* LV-free wt-iPSCs lines. The same vector was, however, unable to reprogram DNA-PKcs deficient cells. Because of the high reprogramming efficiency yielded by the T2/OSKM SB reprogramming transposon, true iPSCs with *Prkdc*^{scid} genotype could be generated by this non-viral reprogramming approach. Because of the similar VCN found in LV-iPSC and Tn-iPSC clones isolated from wt MEFs, differences in the reprogramming efficacy of both reprogramming vectors should reside on either the different gene delivery technologies or on the different design of the promoters and transcription factor genes, which may incur in differential levels, performance or stoichiometry of reprogramming factors expression. Our data also corroborates that the inclusion of c-Myc clearly favored cell reprogramming, as it is deduced from the reprogramming efficacies of the two reprogramming LVs (figures 45 and 53).

Deficiency in DNA-PKcs causes SCID in both humans (van der Burg et al., 2009; Woodbine et al., 2013) and in other mammals (Bosma et al., 1983; Wiler et al., 1995; Mashimo et al., 2012). Function of DNA-PKcs in NHEJ, a major defense mechanism against DSB during interphase, makes this model adequate to study the implication of this repair pathway in the generation and maintenance of cell pluripotency. Several DNA repair proteins have been already reported to interact with the cell reprogramming process: FANCA (Raya et al., 2009), FANCC (Muller et al., 2012; Yung et al., 2013), FANCD2 (Muller et al., 2012) and BRCA2 (Navarro et al., 2013; Yung et al., 2013), which are FA proteins involved in resolving ICLs; ataxia-telangiectasia mutated (ATM), which is a signal transducer of different DNA repair pathways (Kinoshita et al., 2011) and xeroderma pigmentosum C (XPC), which belongs to the nucleotide exchange repair pathway (Fong et al., 2011). Taking together, the involvement of these pathways in cell reprogramming highlights the necessity of an accurate DNA-damage response that assures the integrity upon the reprogramming stress. However, until our work, there was no evidence regarding the possible involvement of NHEJ proteins in the induction of pluripotency.

The rationale of our investigations came from the observation that readily efficient reprogramming vectors yielded low numbers of AP⁺ colonies in *Prkdc*^{scid} MEFs (figure 44). Besides, colonies were prematurely lost or differentiated after the first passages *in vitro*. This intriguing resistance to cell reprogramming was independent of the use of c-Myc containing reprogramming LVs or even the delivery method of the reprogramming factors (figure 53).

Shortly after disclosure of our data, other authors independently reached the same conclusions about the NHEJ impact in cell reprogramming, in that case using cells from LIG IV SCID patients. They demonstrated the NHEJ missfunction in iPSC derived cell lines, whose implications extended over the re-differentiation of such pluripotent cells (Tilgner et al., 2013a). The same group also generated iPSCs from CERNUNOS (XLF) deficient fibroblasts, which after cell reprogramming were unable to normally differentiate to certain lineages (Tilgner et al., 2013b). All these results highlight the relevance of NHEJ in both somatic cell reprogramming and cell differentiation.

Reported barriers to cell reprogramming include eroded telomeres (Marion et al., 2009; Batista et al., 2011), cell cycle arrest (Li et al., 2009) and p53 activation (Marion et al., 2009). Consequently, we considered that the telomere status in Scid cells prior to and after transduction/transfection with LV and SB vectors could play a role in the defective reprogramming of DNA-PKcs deficient cells. Remarkably, we found enlarged telomeres in early passage *Prkdc*^{scid} MEFs (**figure 45**), in grand consistency with previous reports from fresh *Prkdc*^{scid} BM cells (Hande et al., 1999) but contrasting with studies in *Prkdc*^{scid} and *Prkdc*^{null} cell lines (Goytisolo et al., 2001). Besides, despite the significant differences found in the reprogramming success of Scid cells, telomere differences were not affected after cell transduction with STEMCCA LVs or transfection with the T2/OSKM reprogramming SB transposon (**figures 47 and 53**). This fact discarded the fact that eroded telomeres could account for the inefficient cell reprogramming of DNA-PKcs deficient cells. However, the gain of telomere repeats in culture strongly suggests defects in DNA capping, implying that we cannot discard the possibility that described implications of DNA-PKcs in telomere capping (Gilley et al., 2001) could also account for the reprogramming resistance of *Prkdc*^{scid} cells.

Active proliferation warranting the dilution of original cell epigenetic marks is also required for complete cell reprogramming. At the early passages after transduction with the reprogramming STEMCCA LV, a similar proliferation rate was observed in wt and *Prkdc*^{scid} cells. Furthermore, transduction of reprogramming-LV resulted in a mild increment in the rate of the cell doublings, which reached statistical differences in DNA-PKcs deficient transduced cells (**figure 47**). In the case of Scid cells, increased cell proliferation may result in a parallel induction of proliferation-associated DNA damage, which might not be well tolerated by these DNA repair deficient cells.

Although LVs transduce target cells in all cell cycle stages, including G₀ (Naldini et al., 1996), some authors have contradictory reports about the relevance of DNA-PKcs in the efficacy of retroviral transduction (Baekelandt et al., 2000; Daniel et al., 2004). Therefore, we initially thought that differences in the efficiency of cell transduction were having a definitive impact on the reprogramming success. Thus, we followed mCherry expression in MEF cultures, either wt or Scid, after the transduction with the reprogramming STEMCCA RedLight LV. When cells were analyzed by flow cytometry 3 days after transduction, both cell types presented similar percentages of mCherry positive cells, which were dependent on the MOI used (**figure 48**). This suggested that adhesion and entrance of the vector in both cell types did not significantly differ. We waited for one week, to allow clearance of non-integrated vector DNA, and then we measured again the mCherry fluorescence. Consistent with previous analyses obtained at day 3, similar percentages were obtained in wt and Scid MEFs when the same MOIs were compared, discarding that the impaired reprogramming of Scid cells could be accounted by reduced susceptibility of these cells to be transduced with LVs.

To clarify if any cell cycle regulator was limiting cell reprogramming in DNA-PKcs deficient cells, we analyzed mRNA expression of *tp53*, *p21/CIP1*, *p15/INK^{4a}* and *p16/INK^{4b}* after transduction with STEMCCA LV. We chose to check these factors 10 days after transduction based on previous reports (Marion et al., 2009). Significantly, we found a specific increase in the expression of *p16/INK^{4a}* in the Scid cells after transduction with the reprogramming LV. The function of *p16/INK^{4a}* is to promote cell cycle arrest and senescence and it is known to be a late responding element often activated downstream of p53 and retinoblastoma (RB). Functional activation of *p16/INK^{4a}* should result in an increment of associated β -galactosidase staining at suboptimal pH.

In fact, ten days after STEMCCA mCherry transduction, Scid MEFs, but not wt MEFs, exhibited an increased tendency of SA- β -Gal staining, suggesting a Scid-specific senescence response against cell reprogramming.

To further investigate whether the generation of Scid iPSCs could be achieved by a different reprogramming platform, we aimed to generate Scid iPSCs using a non-viral approach based on from the transfection of an efficient T2/OSKM SB transposon and the hyperactive SB100X transposase. Although, T2/OSKM yielded more AP⁺ colonies in both cell types, differences between wt and *Prkdc*^{scid} cells were evident (**figure 52**). This further supported the Scid-specific refractoriness to cell reprogramming. Fortunately, despite the loss and/or differentiation of most Scid iPSCs clones, some Scid colonies generated by the reprogramming transposon could be isolated and expanded *in vitro*. These SB transposon iPSC clones were named Tn-iPS since they have a T2/OSKM cassette stably integrated in their genome.

Then, we tried to discern the molecular basis accounting for the marked differences in the reprogramming of the Scid cells between the reprogramming T2/OSKM SB transposon and STEMCCA LV. We evaluated the SB-transposon VCN in the Tn-iPS cells and values were in a range between 1 and 2 copies per cell, similar to the the ones found in wt LV-iPSCs, suggesting that similar insertion efficiencies were shared among the two platforms. We also confirmed that transfection of the reprogramming T2/OSKM did not affect the telomere length of transfected MEFs (**figure 53**). Transfected cells resembled in most features LV-transduced cells, yet we found a differential expression profile of *p16/INK^{4b}*. A very homogenous expression of *tp53*, *p21/CIP1*, *p15/INK^{4a}* and *p16/INK^{4b}* was described in T2/OSKM reprogramming SB transfected and mock MEFs. To confirm this lack of *p16/INK^{4b}* induction by reprogramming-SB in *Prkdc*^{scid} cells, we scored the percentage of SA- β -Gal 10 days after transfection and, consistent with *p16/INK^{4b}* analyses, we did not detect any differences in the percentage of senescent cells compared to wt cells (**figure 54**).

Related to Tn-iPSCs characterization, wt and Scid cell types yielded indistinguishable colonies in terms of morphology and expression of pluripotency markers. Scid clones retained normal chromosome numbers and were able to form teratomas generating tissues from the three germ layers after subcutaneous implantation in NSG host mice (**figure 56**).

The *Prkdc*^{scid} mutation was confirmed in Scid Tn-iPSCs discarding that cross-contamination of wt cells or even spontaneous reversion of the point mutation could justify the success of cell reprogramming. To further confirm this point, DNA-PKcs deficient Tn-iPSCs were exposed to X-Ray to assess their sensitivity to IR. Despite being more sensitive to IR than their parental fibroblasts, Scid Tn-iPSCs cells preserved an hypersensitive phenotype compared to wt iPSCs (**figure 57**).

To sum up, the data presented in this section of the thesis demonstrates for the first time that non-functional NHEJ results in a cell reprogramming impairment. This has been demonstrated using either viral or non-viral cell reprogramming platforms. Besides, we studied the factors that could account for the inhibited reprogramming of *Prkdc*^{scid} cell and observed that reprogramming LVs triggered a significant senescent response accompanied by *p16/INK^{4b}* induction.

Mutations in the *PRKDC* gene encoding DNA-PKcs have a direct implication, not only in immune cell maturation and neurological development (Pankotai et al., 2012; Woodbine et al., 2013) but also in HSC function. Besides, DNA-PKcs are proposed as a suitable target for experimental therapies aiming to increase the efficiency of radio/chemotherapies against certain cancers (Kashishian et al., 2003), as well as to avoid massive cell death during HIV infection (Cooper et al., 2013). Under these perspectives, the Scid Tn-iPS model presented herein offers an

outstanding platform to better understand the implications of DNA-PKcs mutations during stem cell development and differentiation and also to test new anticancer therapies.

VIII.- CONCLUSIONS

1.- PRECLINICAL EVALUATION OF THE EFFICACY AND THE SAFETY OF A PGK-FANCA-Wpre* LENTIVIRAL VECTOR (FANCA-LV) IN A MOUSE MODEL OF FANCONI ANEMIA-A

1. The *ex vivo* gene therapy of *Fanca*^{-/-} mice with the VSV-G pseudotyped FANCA-LV designed for human clinical trials efficiently corrected the phenotype of *Fanca*^{-/-} hematopoietic progenitors and stem cells without evidences of toxicity.
2. Biodistribution studies in gene therapy treated *Fanca*^{-/-} mice showed that the presence of the therapeutic FANCA-LV provirus was restricted to hematopoietic tissues. No evidences of replicating competent lentiviruses were observed in gene therapy treated animals.
3. No clinical adverse effects were observed either in gene therapy treated mice, or in secondary re-transplanted recipients.
4. In contrast to clonal dominances triggered by a known genotoxic γ -retroviral vector, the FANCA-LV integrome characterized in hematopoietic tissues from *Fanca*^{-/-} recipients did not show evident clonal dominances. These results are consistent with the absence of a significant insertional transactivation of oncogenes in these samples.

2.- ANALYSIS OF THE INVOLVEMENT OF THE *Prkdc*^{scid} MUTATION IN CELL REPROGRAMMING

5. The reprogramming efficacy of *Prkdc*^{scid} MEFs was markedly impaired as compared to healthy MEFs, showing the implication of NHEJ in cell reprogramming.
6. Neither a decreased cell proliferation, transduction susceptibility, telomere shortening nor p53 activation could be associated with the impaired reprogramming of *Prkdc*^{scid} MEFs. However, increased SA- β -Gal staining and *p16/INK4a* expression, hallmarks of cell senescence, were observed during the STEMCCA LV reprogramming of *Prkdc*^{scid} MEFs.
7. The use of reprogramming transposons and the SB100X hyperactive transposase, overcame the poor reprogramming efficiency of *Prkdc*^{scid} MEFs, facilitating the generation of *bona fide* *Prkdc*^{scid} Tn-iPS cell lines, which retained the characteristic genotype and phenotype of *Prkdc*^{scid} cells.

IX.- COROLLARY

The use of the *Fancc*^{-/-} mouse model allowed us to demonstrate the efficacy and the safety associated to the PGK-*FANCA*-*wPRE** lentiviral vector designed for human clinical trials. These results offer new preclinical evidence supporting the use of this LV for the gene therapy of FA-A patients.

The impaired reprogramming of *Prkdc*^{scid} cells demonstrates the role of the NHEJ DNA repair pathway in cell reprogramming. Improved reprogramming transposons facilitated, however, the generation of *Prkdc*^{scid} iPSC lines. This pluripotent stem cell model will constitute a new tool to understand the role of NHEJ in cell reprogramming and differentiation, and also to develop novel therapies for DNA-PKcs-deficient SCID patients and to test new drugs targeting the NHEJ pathway.

X.- SUPPLEMENTAL INFORMATION

Table S1.- CIS over 4th order defined by FANCA-LV LIS reported in data bases.

>4th order CIS absent in cancer data bases											
201011101Rik	Ash1l	Cln3	Dync2h1	Gimap8	Itsn1	Lrrc4c	Nbea	Phkg2	Rpl6	Tbc1d10c	Usp25
2310035C23Rik	Aspm	Cnot2	Dyrk1a	Glra3	Kcnq5	Lrrc6	Ncapg	Pign	Sclt1	Tbc1d15	Uty
2810474019Rik	Atp6v0a1	Cnot6l	Ebag9	Glrb	Kdm1	Lrrc8a	Nckap1l	Pik3ip1	Scyl2	Tcfec	Vcpi1
5830405N20Rik	AV249152	Cntln	Ehbp1	Glrx	Kdm2a	Lrrtm4	Nr3c1	Pkhd11l	Sdc2	Tes	Vegfc
5830415L20Rik	Bat2	Cntnap2	Elt1	Gm414	Kdm4c	Lta	Nrxn1	Plekhhg1	Sepp1	Tirap	Vmn2r26
	Abi2	Bcl7c	Crb1	Ero1l	Gm6084	Kdm5d	Luzp1	Nt5dc1	Pnrc2	Sfi1	Tle4
	Acot9	Bicd1	Crisp2	F730047E07Rik	Gm6460	Kif16b	Luzp2	Nup188	Ppargc1a	Sh2d1a	Tmem167
AI316807	Btdb3	D1Ert622e	Fam118b	Gnpnat1	Kif3a	Ly6a	Nupr1	Ppp1r9a	Shank3	Tmem19	Vmn2r85
Akap8l	C79407	D6Wsu116e	Fam174a	Got2	Kif5b	Ly6c2	Obfc1	Ppp2r4	Slc17a8	Tmem219	Vmn2r87
Alkbh8	Capn1	D930015E06Rik	Fam181b	Gp49a	Klhdc7b	Ly6i	Olfr921	Prdx4	Slc25a21	Tmem71	Vps13b
	Alx1	Casp1	Dap3	Fam55c	Gprasp1	Klhl28	Man1a	Olfr923	Prpf39	Slc38a10	Tmx3
	Amn1	Casp12	Dcun1d5	Fbxo4	Grm3	Kpna1	Mctp1	Ophn1	Ptpn4	Slc4a10	Tom1l1
	Ankib1	Ccdc101	Ddx3y	Frk	Grm4	Lilrb4	Mdga2	Oxct1	Rab10	Slk	Tpk1
	Ankrd17	Ccdc88a	Dennd5b	Frmd8	Gtdc1	Lims1	Mgat4c	Pcnp	Ranbp2	Smurf2	Trpc6
	Anxa1	Ccnh	Dgkk	Fstl5	Gvin1	Lingo2	Mkrrn3	Pdgfc	Rarb	Snca	Tsepa
	Ar	Ccr1l1	Diap2	Fxr1	Hgf	Lix1	Mmp13	Peg12	Rasal2	Snx16	Ttc17
	Arfgef1	Ccr3	Dlg2	Gabpa	Hirip3	Lmln	Mmp16	Pgcp	Rassf9	Spc3	Tusc3
	Arhgap15	Cdc2l5	Dnajc18	Galns	Hispdp1	Lphn3	Morc2a	Pglyrp2	Rchy1	St8sia4	Txndc16
	Arhgef18	Cdh2	Dok6	Gap43	Hs3st1	Lrch3	Mrps31	Phf14	Rhag	Stat4	Ube3a
	Arid4b	Cep97	Dpf2	Gcc2	Il27	Lrp6	N4bp2	Phf20l1	Rhod	Styx	Uevld
	Ascc3	Chl1	Dpp4	Gdpd3	Itga5	Lrrc40	Nav3	Phip	Rpl24	Sult1a1	Uhrf1bp1l
											Zhx1
RTCGD											
Aff4	Bahcc1	Dach1	Fchs2	Hspa4	Mcc	Olfr693	Ppp6c	Rhoh	Sgk3	Tbl1xr1	Tusc1
Ahsa2	Calcr1	Dach2	Ftmt	Ikzf2	Mnd1	Pam	Prr14	Robo1	Slc16a7	Tex2	Ube2d2
Akap13	Casp4	Der1l	Fusip1	Kif3c	Msh5	Pcdh15	Ptpk	Robo2	Slc20a2	Tmem49	Vars
App	Ccr2	Dmxl1	Ghr	Lcorl	Mthfd1l	Pecam1	Rab38	Rps6ka1	Slc8a1	Tnfrsf11a	Wac
Arid1a	Cdt1	Ell2	Gimap7	Lnpep	Mybl1	Plxdc2	Rab5c	Rpusd4	Stat3	Trafd1	Zeb2
Asxl2	Chchd7	Ets1	Gls	Lrrc7	Ncam2	Plxnd1	Rasa1	Seh1l	Stat5b	Tsg101	D630037F22Rik
AU021838	Ctsc	Fbp1	Gm5d	Ly6e	Nudt3	Ppp4c	Rcbt2	Senp8	Stxbp4	Tsyp1l	
CGD											
		Brd4	Cbfa2t3	Cltc		Ddx10	Ptpn11	Rb1			
RTCGD + CGD											
				Fli1		Mlt3		Plag1			

Table S2.- Ingenuity Pathway Analyses (IPA) of *FANCA*-LV integrome in *Fanca*^{-/-} recipients.

Upstream Regulator	Molecule Type	p-value of overlap	Target molecules in dataset
TGFB1	growth factor	5.24 x10 ⁻⁵	ASPM, C9orf3, CASP4, CBFA2T3, CDH2, CDT1, ITGA5, Ly6a (includes others), MMP13, MYBL1, NCAPG, PECAM1, PTPRK, RHOD, SMURF2, STAT3, ZEB2
ERBB2	kinase	4.16 x10 ⁻⁴	ASPM, CBFA2T3, CDT1, DERL1, GPD3, GHR, ITGA5, MAN1A1, MMP13, MYBL1, NCAPG, PTPRK, RHOD, VEGFC
DDIT3	transcription regulator	4.36 x10 ⁻⁴	CASP4, ERO1L, PPARGC1A
PTH1R	G-protein coupled receptor	9.32 x10 ⁻⁴	AR, MMP13, TNFRSF11A
IL12A	cytokine	1.07 x10 ⁻³	IL27, PECAM1, STAT3, STAT4
EGR4	transcription regulator	1.19 x10 ⁻³	AR, MYBL1
GMNN	transcription regulator	2.93 x10 ⁻³	CDT1, DYRK1A
FOXF1	transcription regulator	2.93 x10 ⁻³	HGF, ITGA5
ERCC3	enzyme	2.93 x10 ⁻³	CCNH, GHR
CD24 (human)	other	2.96 x10 ⁻³	ASPM, DIAPH2, FXR1, RANBP2, RASA1, VPS13B
HNRNPA2B1	other	3.86 x10 ⁻³	ALX1, CRB1, PDGFC, PPARGC1A, SFI1 (includes EG:305467), ST8SIA4, SULT1A3/SULT1A4
PPM1A	phosphatase	4.07 x10 ⁻³	ITGA5, MMP13
NKX3-1	transcription regulator	4.47 x10 ⁻³	AR, ETS1, PTPRK, STAT3
FMR1	other	5.37 x10 ⁻³	App, FXR1
MEP1B	peptidase	6.53 x10 ⁻³	App, CRISP2, TSG101
TAF1 (includes EG:270627)	transcription regulator	6.84 x10 ⁻³	AR, GHR
HIST1H1T	other	7.78 x10 ⁻³	CBFA2T3, CCDC101, HSPA4, RCHY1, TEX2
TGFB2	kinase	7.85 x10 ⁻³	AR, CASP1, CDH2, HGF, MMP13, UBE3A
HIST1H1A	other	8.16 x10 ⁻³	CBFA2T3, CCDC101, HSPA4, RCHY1, TEX2
NPC2 (includes EG:10577)	other	8.47 x10 ⁻³	STAT3, STAT4
LIF	cytokine	8.96 x10 ⁻³	ARID1A, FBP1, HGF, LIMS1, STAT3
IL13	cytokine	1.02 x10 ⁻²	CASP1, CHCHD7, CTSC, MMP13, PDGFC, PPARGC1A, SLC8A1, ST8SIA4, TNFRSF11A
IL24	cytokine	1.03 x10 ⁻²	CASP12, IL27
IFN alpha/beta	group	1.06 x10 ⁻²	CCR2, IL27, Ly6a (includes others), LY6E
CBFB	transcription regulator	1.06 x10 ⁻²	IKZF2, MMP13, SMURF2, STAT4
SIRT1	transcription regulator	1.06 x10 ⁻²	ERO1L, HGF, PPARGC1A, STAT3
PKD1	ion channel	1.12 x10 ⁻²	Ddx3y, GLS, GPRASP1, KLHL28, SFI1 (includes EG:305467), SLC8A1, VPS13B
mir-182	microRNA	1.14 x10 ⁻²	CASP12, LRP6, RASA1
IL6	cytokine	1.21 x10 ⁻²	ANXA1, CASP1, CCR3, MMP13, RASA1, RB1, STAT3, STAT4, TNFRSF11A
STAT6	transcription regulator	1.26 x10 ⁻²	Gp49a/Lilrb4, Ly6a (includes others), PDGFC, PPARGC1A, STAT4, TFEC, TNFRSF11A
mir-451	microRNA	1.43 x10 ⁻²	PPP6C, RASA1
mir-144	microRNA	1.43 x10 ⁻²	PPP6C, RASA1
TGFB3	growth factor	1.43 x10 ⁻²	ETS1, ZEB2
Ces1b/Ces1c	enzyme	1.43 x10 ⁻²	GHR
ECE2	peptidase	1.43 x10 ⁻²	App
SNX33	other	1.43 x10 ⁻²	App
FBXL2	enzyme	1.43 x10 ⁻²	App
FXR2	other	1.43 x10 ⁻²	FXR1
KLC1 (includes EG:100536245)	other	1.43 x10 ⁻²	App
SERPINA3	other	1.43 x10 ⁻²	App
APBA1	transporter	1.43 x10 ⁻²	App
CASP7	peptidase	1.43 x10 ⁻²	CASP4
miR-211-5p (and other miRNAs w/seed UCCUUUU)	mature microRNA	1.43 x10 ⁻²	PTPN11
ECE1	peptidase	1.43 x10 ⁻²	App
BTG1	transcription regulator	1.43 x10 ⁻²	NR3C1
VPS26A	transporter	1.43 x10 ⁻²	App
TUBG1	other	1.43 x10 ⁻²	RB1
IRF6	transcription regulator	1.43 x10 ⁻²	CDH2
RB1	transcription regulator	1.44 x10 ⁻²	CASP4, CDT1, PPARGC1A, PTPN4, RB1, ZEB2

MTOR	kinase	1.45 x10 ⁻²	AR, CASP1, STAT3
ANXA7	ion channel	1.54 x10 ⁻²	CDH2, HGF, NR3C1, TSG101
CLEC11A	growth factor	1.56 x10 ⁻²	ANXA1, CDH2, STAT4
LRP6	transmembrane receptor	1.65 x10 ⁻²	LRP6, PPARGC1A
MGAT5	enzyme	1.65 x10 ⁻²	CDH2, ITGA5
estrogen receptor	group	2.01 x10 ⁻²	ANXA1, ETS1, LY6E, MAN1A1, NCAM2, PDGFC, VEGFC
RAC2	enzyme	2.06 x10 ⁻²	ANXA1, CDH2, STAT4
IL12B	cytokine	2.06 x10 ⁻²	LTA, STAT3, STAT4
CASP3	peptidase	2.13 x10 ⁻²	CASP4, RB1
RELB	transcription regulator	2.19 x10 ⁻²	CCR3, LTA, STAT4
HIF1A	transcription regulator	2.27 x10 ⁻²	CCR2, ERO1L, ETS1, HSPA4, ITGA5, TMEM19, VEGFC
mir-17	microRNA	2.40 x10 ⁻²	ARID4B, STAT3
TWIST2	transcription regulator	2.40 x10 ⁻²	CDH2, ZEB2
ZBTB20	other	2.63 x10 ⁻²	GHR, NR3C1, PPARGC1A
VEGFA	growth factor	2.63 x10 ⁻²	ETS1, MMP13, PPARGC1A
FGF21	growth factor	2.67 x10 ⁻²	GHR, PPARGC1A
miR-17-5p (and other miRNAs w/seed AAAGUGC)	mature microRNA	2.67 x10 ⁻²	RB1, STAT3
SIX1	transcription regulator	2.67 x10 ⁻²	DACH1, DACH2
DHCR24	enzyme	2.83 x10 ⁻²	App
Atf	group	2.83 x10 ⁻²	RB1
ERCC2	enzyme	2.83 x10 ⁻²	CCNH
GTF2H1	transcription regulator	2.83 x10 ⁻²	CCNH
MEFV	other	2.83 x10 ⁻²	CASP1
PMEPA1	other	2.83 x10 ⁻²	AR
IL20	cytokine	2.83 x10 ⁻²	TNFRSF11A
MYBBP1A	transcription regulator	2.83 x10 ⁻²	PPARGC1A
APBB1	transcription regulator	2.83 x10 ⁻²	CASP4
miR-132-3p (and other miRNAs w/seed AACAGUC)	mature microRNA	2.83 x10 ⁻²	RB1
miR-193b-3p (and other miRNAs w/seed ACUGGCC)	mature microRNA	2.83 x10 ⁻²	ETS1
mir-489	microRNA	2.83 x10 ⁻²	PTPN11
miR-199a-5p (and other miRNAs w/seed CCAGUGU)	mature microRNA	2.83 x10 ⁻²	DYRK1A
IDE	peptidase	2.83 x10 ⁻²	App
LOC100360765/Ptger2	G-protein coupled receptor	2.83 x10 ⁻²	App
ITIM2B	other	2.83 x10 ⁻²	App
NCOA4	transcription regulator	2.83 x10 ⁻²	AR
BCAN	other	2.83 x10 ⁻²	CDH2
PSIP1	other	2.83 x10 ⁻²	VEGFC
MNAT1	other	2.83 x10 ⁻²	CCNH
QPCT	enzyme	2.83 x10 ⁻²	App
FIGF	growth factor	2.83 x10 ⁻²	VEGFC
VSNL1	other	2.83 x10 ⁻²	ITGA5
COL11A1	other	2.83 x10 ⁻²	MMP13
SORL1	transporter	2.83 x10 ⁻²	App
RHCE/RHD	transporter	2.83 x10 ⁻²	RHAG
LHX2	transcription regulator	2.96 x10 ⁻²	NCAM2, ROBO1
SOD1	enzyme	3.10 x10 ⁻²	CDH2, HSPA4, MYBL1, STAT4
IL2	cytokine	3.17 x10 ⁻²	CCR2, ETS1, LTA, Ly6a (includes others), PECAM1
ZMPSTE24	peptidase	3.26 x10 ⁻²	GHR, STAT5B
mir-1	microRNA	3.26 x10 ⁻²	ATP6V0A1, RASA1
RGS10	other	3.27 x10 ⁻²	CASP1, CCR3, LTA
MMP14	peptidase	3.57 x10 ⁻²	CDH2, NR3C1
PTGER4	G-protein coupled receptor	3.57 x10 ⁻²	App, MMP13

THBS4	other	3.57 x10 ⁻²	MMP13, MMP16
TAF4 (includes EG:100149942)	transcription regulator	3.60 x10 ⁻²	ETS1, MMP13, PDGFC, VEGFC
ETS1	transcription regulator	3.67 x10 ⁻²	CASP1, HGF, IKZF2, MMP13, ZEB2
LDL	complex	3.81 x10 ⁻²	CCR2, LIMS1, PECAM1
HRAS	enzyme	3.81 x10 ⁻²	HGF, ITGA5, STAT3
Interferon alpha	group	3.88 x10 ⁻²	CASP1, IL27, MORC2, RB1, STAT4
FAM3B	cytokine	4.22 x10 ⁻²	CASP4, ITGA5
Hbb	other	4.22 x10 ⁻²	PECAM1
VAV	group	4.22 x10 ⁻²	STAT3
CRTC3	other	4.22 x10 ⁻²	PPARGC1A
PDLIM2	other	4.22 x10 ⁻²	STAT4
GALNT6	enzyme	4.22 x10 ⁻²	CDH2
PRDM16	transcription regulator	4.22 x10 ⁻²	HGF
Gamma tubulin	group	4.22 x10 ⁻²	RB1
EMP2	other	4.22 x10 ⁻²	ITGA5
MCRS1	other	4.22 x10 ⁻²	RB1
mir-8	microRNA	4.22 x10 ⁻²	ZEB2
mir-204	microRNA	4.22 x10 ⁻²	PTPN11
TNFRSF11B	transmembrane receptor	4.22 x10 ⁻²	TNFRSF11A
TIAL1	transcription regulator	4.22 x10 ⁻²	MMP13
ETV1	transcription regulator	4.22 x10 ⁻²	MMP13
VSX2	transcription regulator	4.22 x10 ⁻²	TFEC
DDR2 (includes EG:18214)	kinase	4.22 x10 ⁻²	MMP13
CHRM4	G-protein coupled receptor	4.22 x10 ⁻²	ITGA5
ANK1	other	4.22 x10 ⁻²	RHAG
MME	peptidase	4.22 x10 ⁻²	App
ATP7A	transporter	4.22 x10 ⁻²	PAM
PTGDS	enzyme	4.22 x10 ⁻²	PTPN11
S1PR3	G-protein coupled receptor	4.22 x10 ⁻²	HGF
CLDN2	other	4.22 x10 ⁻²	ITGA5
STAT5A	transcription regulator	4.28 x10 ⁻²	AR, CASP4, STAT5B, TNFRSF11A
PRKAG3	kinase	4.38 x10 ⁻²	OXCT1, PAM, PPARGC1A
NLRP12	other	4.56 x10 ⁻²	CASP1, NR3C1
STAT5B	transcription regulator	4.72 x10 ⁻²	AR, CASP4, ST8SIA4, TNFRSF11A
TP53 (includes EG:22059)	transcription regulator	4.94 x10 ⁻²	ANXA1, App, AR, CASP1, CASP4, CDT1, DPP4, EBAG9, GLRX, Ly6a (includes others), MMP13, MYBL1, NCAPG, PECAM1, PPP4C, PTPN11, RB1, ROBO1, RPS6KA1, SMURF2

© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved

Table S3- Putative dominant LIS (>20% clonal contribution) in 56 engrafted recipients analyzed.

LIS	Ch.	Position	Sample	Total reads	Clone reads	Contribution	Gene product	RTCGD
Acot9	X	151704359	M077_6m_bm	354	112	31,64%	acyl-CoA thioesterase 9	NO
Asxl2	12	3502910	M080_6m_bm	1002	316	31,54%	additional sex combs like 2 (Drosophila)	1 RV
Cdh11	8	105162249	M025_6m_bm	1450	478	32,97%	cadherin 11	NO
Cdh2	18	16962235	M026_1m_pb	4658	1232	26,45%	cadherin 2	NO
			M026_3m_pb	4089	830	20,30%		
Dcun1d5	9	7202127	M037_6m_bm	4708	1041	22,11%	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 5 (S. cerevisiae)	NO
Depdc5	5	33204426	M025_1m_pb	3060	603	19,71%	DEP domain containing 5	NO
Dgkk	X	6526016	M043_6m_bm	4801	3395	70,71%	diacylglycerol kinase kappa	NO
			M045_6m_bm	3214	2091	65,06%		
Diap2	X	126436031	M076_6m_bm	4191	970	23,14%	diaphanous homolog 2 (Drosophila)	NO
Dyrk1a	16	94798383	M032_6m_bm	6270	1530	24,40%	dual-specificity tyrosine- (Y)-phosphorylation regulated kinase 1a	1 Tn
Fhit	14	10587330	M075_6m_bm	1602	377	23,53%	fragile histidine triad gene	2 TN
Ghitm	14	38106174	M033_6m_bm	1575	395	25,08%	growth hormone inducible transmembrane protein	1 RV
Glr3	8	58560604	M059_6m_bm	2848	626	21,98%	glycine receptor, alpha 3 subunit	NO
			M065_6m_bm	2925	571	19,52%		
Il6st	13	113270903	M066_6m_bm	2596	563	21,69%	interleukin 6 signal transducer	3 RV
Itga4	2	79012652	M024_6m_bm	1124	383	34,07%	integrin alpha 4	1 RV
			M024_6m_pb	2764	547	19,79%		
Itsn1	16	91764098	M026_6m_bm	3176	2172	68,39%	intersectin 1 (SH3 domain protein 1A)	NO
			M026_6m_pb	4736	3059	64,59%		NO
			M026_3m_pb	4089	803	19,64%		NO
Kdm1	4	136120411	M055_6m_bm	6270	2145	34,21%	lysine (K)-specific demethylase 1A	NO
Kif5b	18	6223964	M050_6m_bm	2291	1495	65,26%	kinesin family member 5B	NO
Mark3	12	112834923	M028_6m_pb	2593	581	22,41%	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	NO
Nav3	10	109222758	M031_1m_pb	3655	1151	31,49%	neuron navigator 3	NO
			M027_6m_pb	1754	363	20,70%		
Plscr1	9	92006458	M046_6m_bm	3094	752	24,31%	phospholipid scramblase 1	NO
Rasal2	1	159098055	M038_6m_bm	6891	1493	21,67%	RAS protein activator like 2	1 Tn
Rchy1	5	92388204	M023_6m_bm	1139	324	28,45%	ring finger and CHY zinc finger domain containing 1	NO
Repeat	8	19691766	M030_1m_pb	1811	445	24,57%		NO
Smg1	7	125358722	M030_6m_bm	1462	689	47,13%	SMG1 homolog, phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (C. elegans)	NO
Snca	6	61703897	M044_6m_bm	5306	3496	65,89%	synuclein, alpha	1 Tn
			M047_6m_bm	2747	1347	49,04%		1 Tn
			M046_6m_bm	3094	746	24,11%		1 Tn
Sqrdl	2	122600280	M063_6m_bm	2026	426	21,03%	sulfide quinone reductase-like (yeast)	NO
Tle4	19	14802973	M041_6m_bm	4177	2858	68,42%	transducin-like enhancer of split 4, homolog of Drosophila E (spl)	NO
Tlk1	2	70586677	M079_6m_bm	1026	240	23,39%	tousled-like kinase 1	NO
Tnn	1	161947233	M040_6m_bm	5057	1499	29,64%	tenascin N	3 TN
Ube2d2	18	35962588	M029_6m_bm	3028	979	32,33%	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	3 RV
			M029_3m_pb	4520	1098	24,29%		3 RV
Vstm2a	11	16254006	M046_6m_bm	3094	892	28,83%	V-set and transmembrane domain containing 2A	NO

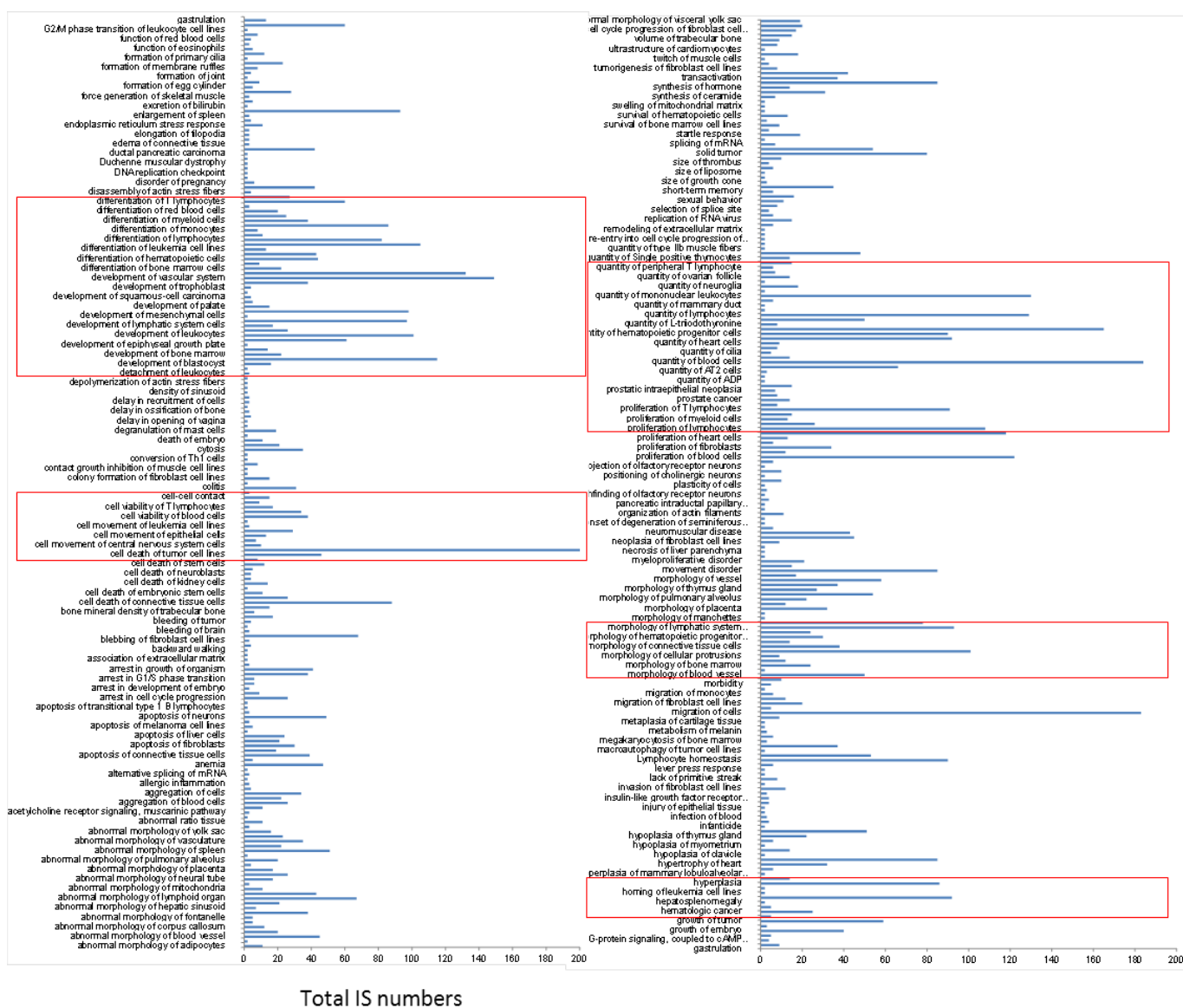


Figure S1A: Unique IPA functional categories of LV targeted genes in *Fanca*^{-/-} mice.

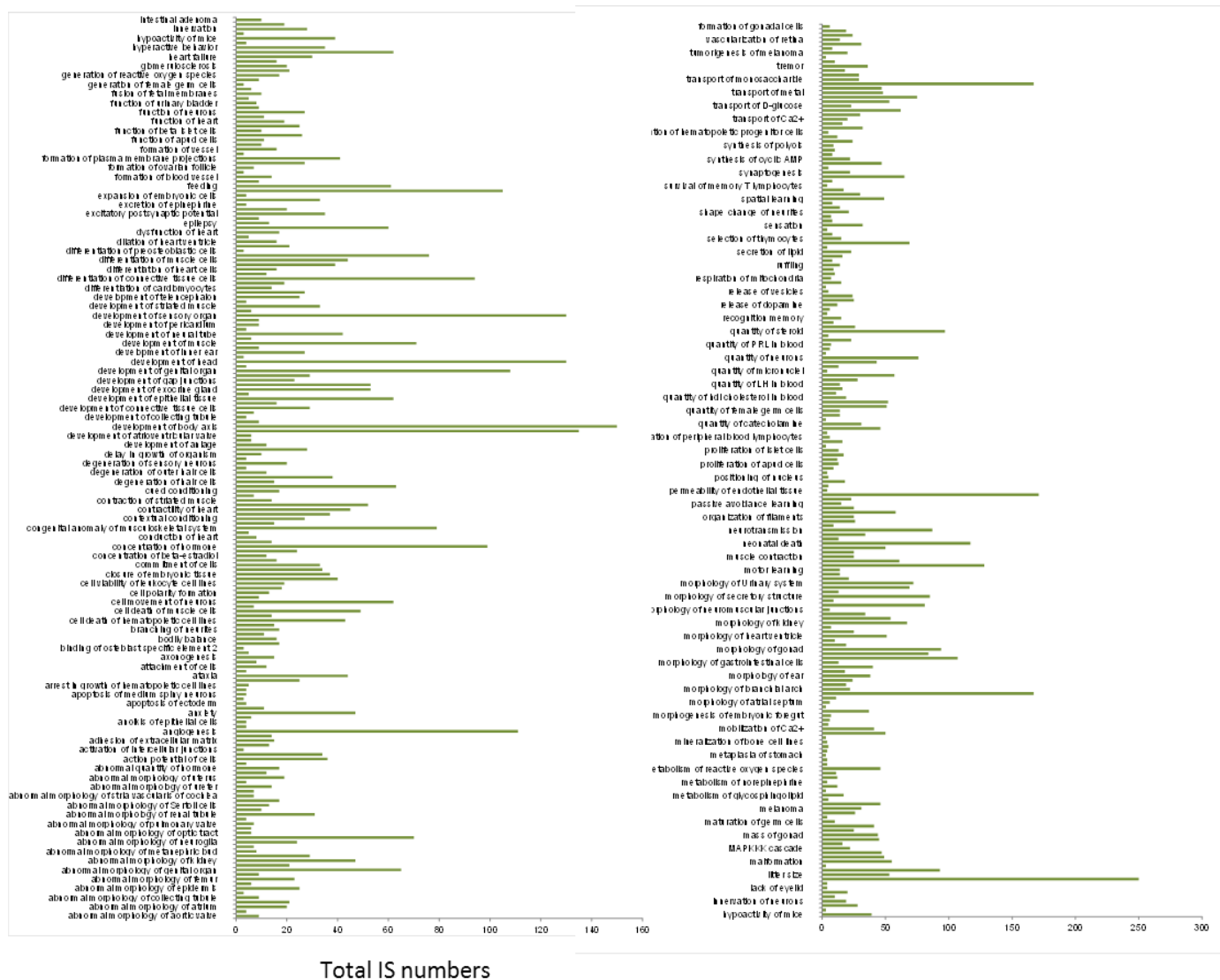


Figure S1B: Unique IPA functional categories of LV targeted genes from computer simulated random IS.

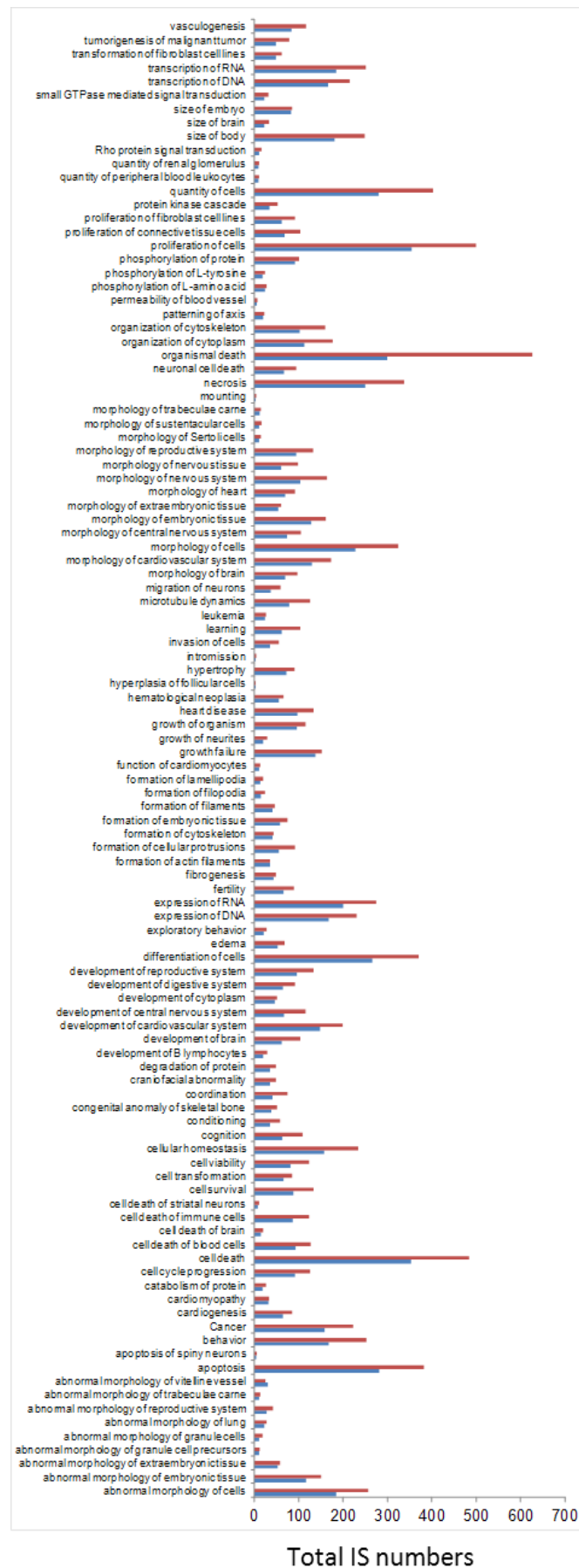


Figure S1C: Overlapping functional categories between random IS and LV targeted genes in *Fanca*^{-/-} mice.

XI.- BIBLIOGRAPHY

- Abkowitz, J.L., Catlin, S.N., McCallie, M.T., and Gutter, P. (2002). Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood* 100, 2665-2667.
- Agoulis, A.I., Lu, B., Zhu, Q., Truong, C., Ty, M.T., Arango, N., Chada, K.K., and Bishop, C.E. (2002). A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd. *Hum Mol Genet* 11, 3047-3053.
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M.P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M.C., *et al.* (2013). Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy in Patients with Wiskott-Aldrich Syndrome. *Science*.
- Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R.M., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2004). RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res* 32, D523-527.
- Akkin, R.K., Walton, R.M., Chen, M.L., Li, Q.X., Planelles, V., and Chen, I.S. (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70, 2581-2585.
- Almaraz, D., Bussadori, G., Navarro, M., Mavilio, F., Larcher, F., and Murillas, R. (2011). Risk assessment in skin gene therapy: viral-cellular fusion transcripts generated by proviral transcriptional read-through in keratinocytes transduced with self-inactivating lentiviral vectors. *Gene Ther* 18, 674-681.
- Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M.A., Chen, D.J., and Nickoloff, J.A. (2002). DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3758-3763.
- Allsopp, R.C., Cheshier, S., and Weissman, I.L. (2001). Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 193, 917-924.
- Araki, R., Fujimori, A., Hamatani, K., Mita, K., Saito, T., Mori, M., Fukumura, R., Morimyo, M., Muto, M., Itoh, M., *et al.* (1997). Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2438-2443.
- Arlett, C.F., and Lehmann, A.R. (1978). Human disorders showing increased sensitivity to the induction of genetic damage. *Annu Rev Genet* 12, 95-115.
- Auerbach, A.D. (2009). Fanconi anemia and its diagnosis. *Mutat Res* 668, 4-10.
- Avery, O.T., Macleod, C.M., and McCarty, M. (1944). Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type iii. *J Exp Med* 79, 137-158.
- Baekelandt, V., Claeys, A., Cherepanov, P., De Clercq, E., De Strooper, B., Nuttin, B., and Debyser, Z. (2000). DNA-Dependent protein kinase is not required for efficient lentivirus integration. *J Virol* 74, 11278-11285.
- Bakker, S.T., van de Vrugt, H.J., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Steltenpool, J., Delzenne-Goette, E., van der Wal, A., van der Valk, M., Joenje, H., te Riele, H., *et al.* (2009). Fanconi-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M. *Hum Mol Genet* 18, 3484-3495.
- Baños, R., Valeri, A., Álvarez, L., Pujol, R.M., Segovia, J.C., Ligos, J.M., Montoya, M., Surrallés, J., Casado, J.A., Bueren, J.A., *et al.* (2011). Engraftment of immunodeficient mice with Fanconi Anemia-like Hematopoietic Repopulating Cells: A New Humanized Model of Fanconi Anemia. In XXIII Fanconi Anemia research Foundation (Barcelona (Spain)).
- Batista, L.F., Pech, M.F., Zhong, F.L., Nguyen, H.N., Xie, K.T., Zaig, A.J., Crary, S.M., Choi, J., Sebastiano, V., Cherry, A., *et al.* (2011). Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 399-402.
- Bauer, G., Dao, M.A., Case, S.S., Meyerrose, T., Wirthlin, L., Zhou, P., Wang, X., Herrbrich, P., Arevalo, J., Csik, S., *et al.* (2008). In vivo biosafety model to assess the risk of adverse events from retroviral and lentiviral vectors. *Mol Ther* 16, 1308-1315.
- Baum, C., Dullmann, J., Li, Z., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D.A., and von Kalle, C. (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101, 2099-2114.
- Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Gan, O.I., and Dick, J.E. (1998). A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med* 4, 1038-1045.
- Biedermann, K.A., Sun, J.R., Giaccia, A.J., Tosto, L.M., and Brown, J.M. (1991). scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1394-1397.
- Bielorai, B., Hughes, M.R., Auerbach, A.D., Nagler, A., Loewenthal, R., Rechavi, G., and Toren, A. (2004). Successful umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia using preimplantation genetic diagnosis for HLA-matched donor. *Am J Hematol* 77, 397-399.
- Biffi, A., Bartolomei, C.C., Cesana, D., Cartier, N., Aubourg, P., Ranzani, M., Cesani, M., Benedicenti, F., Plati, T., Rubagotti, E., *et al.* (2011). Lentiviral vector common integration sites in preclinical models and a clinical trial reflect a benign integration bias and not oncogenic selection. *Blood* 117, 5332-5339.

- Biffi, A., Montini, E., Loricoli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., Baldoli, C., Martino, S., Calabria, A., Canale, S., *et al.* (2013). Lentiviral Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy Benefits Metachromatic Leukodystrophy. *Science*.
- Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., Tolstoshev, P., *et al.* (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.
- Blau, H.M., Chiu, C.P., and Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32, 1171-1180.
- Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A., *et al.* (1995). Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V (D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell* 80, 813-823.
- Bogliolo, M., Schuster, B., Stoepker, C., Derkunt, B., Su, Y., Raams, A., Trujillo, J.P., Minguillon, J., Ramirez, M.J., Pujol, R., *et al.* (2013). Mutations in ERCC4, encoding the DNA-repair endonuclease XPF, cause Fanconi anemia. *American journal of human genetics* 92, 800-806.
- Bokhoven, M., Stephen, S.L., Knight, S., Gevers, E.F., Robinson, I.C., Takeuchi, Y., and Collins, M.K. (2009). Insertional gene activation by lentiviral and gammaretroviral vectors. *J Virol* 83, 283-294.
- Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., *et al.* (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* 276, 1719-1724.
- Bosma, G.C., Custer, R.P., and Bosma, M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527-530.
- Bouwman, P., Drost, R., Klijn, C., Pieterse, M., van der Gulden, H., Song, J.Y., Szuhai, K., and Jonkers, J. (2011). Loss of p53 partially rescues embryonic development of Palb2 knockout mice but does not foster haploinsufficiency of Palb2 in tumour suppression. *J Pathol* 224, 10-21.
- Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44, 287-299.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38, 455-463.
- Buecker, C., Chen, H.H., Polo, J.M., Daheron, L., Bu, L., Barakat, T.S., Okwieka, P., Porter, A., Gribnau, J., Hochedlinger, K., *et al.* (2010). A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 535-546.
- Bunting, K.D., and Hawley, R.G. (2002). The tao of hematopoietic stem cells: toward a unified theory of tissue regeneration. *ScientificWorldJournal* 2, 983-995.
- Butler, S.L., Hansen, M.S., and Bushman, F.D. (2001). A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo. *Nat Med* 7, 631-634.
- Butturini, A., Gale, R.P., Verlander, P.C., Adler-Brecher, B., Gillio, A.P., and Auerbach, A.D. (1994). Hematologic abnormalities in Fanconi anemia: an International Fanconi Anemia Registry study. *Blood* 84, 1650-1655.
- Camnasio, S., Delli Carri, A., Lombardo, A., Grad, I., Mariotti, C., Castucci, A., Rozell, B., Lo Riso, P., Castiglioni, V., Zuccato, C., *et al.* (2012). The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiol Dis* 46, 41-51.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Bougneres, P., Schmidt, M., Kalle, C.V., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M., and Aubourg, P. (2012). Lentiviral hematopoietic cell gene therapy for X-linked adrenoleukodystrophy. *Methods Enzymol* 507, 187-198.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C.C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., Vidaud, M., Abel, U., Dal-Cortivo, L., Caccavelli, L., *et al.* (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326, 818-823.
- Casado, J.A., Callen, E., Jacome, A., Rio, P., Castella, M., Lobitz, S., Ferro, T., Munoz, A., Sevilla, J., Cantalejo, A., *et al.* (2007). A comprehensive strategy for the subtyping of patients with Fanconi anaemia: conclusions from the Spanish Fanconi Anemia Research Network. *J Med Genet* 44, 241-249.
- Cattoglio, C., Facchini, G., Sartori, D., Antonelli, A., Miccio, A., Cassani, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Howe, S., Thrasher, A.J., *et al.* (2007). Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 110, 1770-1778.
- Cattoglio, C., Maruggi, G., Bartholomae, C., Malani, N., Pellin, D., Cocchiarella, F., Magnani, Z., Ciceri, F., Ambrosi, A., von Kalle, C., *et al.* (2010a). High-definition mapping of retroviral integration sites defines the fate of allogeneic T cells after donor lymphocyte infusion. *PLoS One* 5, e15688.
- Cattoglio, C., Pellin, D., Rizzi, E., Maruggi, G., Corti, G., Miselli, F., Sartori, D., Guffanti, A., Di Serio, C., Ambrosi, A., *et al.* (2010b). High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood* 116, 5507-5517.
- Cavazzana-Calvo, M., Bagnis, C., Mannoni, P., and Fischer, A. (1999). Peripheral stem cells in bone marrow transplantation. *Peripheral blood stem cell and gene therapy. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12, 129-138.

- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K., *et al.* (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 467, 318-322.
- Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J.M., Regairaz, M., Pla, M., Vasquez, N., Zhang, Q.S., Pondarre, C., *et al.* (2012). Bone Marrow Failure in Fanconi Anemia Is Triggered by an Exacerbated p53/p21 DNA Damage Response that Impairs Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 11, 36-49.
- Cesana, D., Sgualdino, J., Rudilosso, L., Merella, S., Naldini, L., and Montini, E. (2012). Whole transcriptome characterization of aberrant splicing events induced by lentiviral vector integrations. *J Clin Invest* 122, 1667-1676.
- Civin, C.I., Trischmann, T., Kadan, N.S., Davis, J., Noga, S., Cohen, K., Duffy, B., Groenewegen, I., Wiley, J., Law, P., *et al.* (1996). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 14, 2224-2233.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E. (1997). The Interactions of Retroviruses and their Hosts.
- Cohen-Haguenauer, O., Peault, B., Bauche, C., Daniel, M.T., Casal, I., Levy, V., Dausset, J., Boiron, M., Auclair, C., Gluckman, E., *et al.* (2006). In vivo repopulation ability of genetically corrected bone marrow cells from Fanconi anemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2340-2345.
- Cooper, A., Garcia, M., Petrovas, C., Yamamoto, T., Koup, R.A., and Nabel, G.J. (2013). HIV-1 causes CD4 cell death through DNA-dependent protein kinase during viral integration. *Nature*.
- Couzin, J., and Kaiser, J. (2005). Gene therapy. As Gelsinger case ends, gene therapy suffers another blow. *Science* 307, 1028.
- Crossan, G.P., van der Weyden, L., Rosado, I.V., Langevin, F., Gaillard, P.H., McIntyre, R.E., Gallagher, F., Kettunen, M.I., Lewis, D.Y., Brindle, K., *et al.* (2011). Disruption of mouse Slx4, a regulator of structure-specific nucleases, phenocopies Fanconi anemia. *Nat Genet* 43, 147-152.
- Chandrasekharappa, S.C., Lach, F.P., Kimble, D.C., Kamat, A., Teer, J.K., Donovan, F.X., Flynn, E., Sen, S.K., Thongthip, S., Sanborn, E., *et al.* (2013). Massively parallel sequencing, aCGH, and RNA-Seq technologies provide a comprehensive molecular diagnosis of Fanconi anemia. *Blood* 121, e138-148.
- Chen, M., Tomkins, D.J., Auerbach, W., McKerlie, C., Youssoufian, H., Liu, L., Gan, O., Carreau, M., Auerbach, A., Groves, T., *et al.* (1996). Inactivation of Fac in mice produces inducible chromosomal instability and reduced fertility reminiscent of Fanconi anaemia. *Nat Genet* 12, 448-451.
- Cheng, N.C., van de Vrugt, H.J., van der Valk, M.A., Oostra, A.B., Krimpenfort, P., de Vries, Y., Joenje, H., Berns, A., and Arwert, F. (2000). Mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia homolog Fanca. *Hum Mol Genet* 9, 1805-1811.
- D'Andrea, A.D., and Grompe, M. (1997). Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. *Blood* 90, 1725-1736.
- Daniel, R., Greger, J.G., Katz, R.A., Taganov, K.D., Wu, X., Kappes, J.C., and Skalka, A.M. (2004). Evidence that stable retroviral transduction and cell survival following DNA integration depend on components of the nonhomologous end joining repair pathway. *J Virol* 78, 8573-8581.
- de Winter, J.P., Leveille, F., van Berkel, C.G., Rooimans, M.A., van Der Weel, L., Steltenpool, J., Demuth, I., Morgan, N.V., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., *et al.* (2000a). Isolation of a cDNA representing the Fanconi anemia complementation group E gene. *American journal of human genetics* 67, 1306-1308.
- de Winter, J.P., Rooimans, M.A., van Der Weel, L., van Berkel, C.G., Alon, N., Bosnoyan-Collins, L., de Groot, J., Zhi, Y., Waisfisz, Q., Pronk, J.C., *et al.* (2000b). The Fanconi anaemia gene FANCF encodes a novel protein with homology to ROM. *Nat Genet* 24, 15-16.
- de Winter, J.P., Waisfisz, Q., Rooimans, M.A., van Berkel, C.G., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Carreau, M., Bender, O., Demuth, I., Schindler, D., *et al.* (1998). The Fanconi anaemia group G gene FANCG is identical with XRCC9. *Nat Genet* 20, 281-283.
- Deichmann, A., Brugman, M.H., Bartholomae, C.C., Schwarzwaelder, K., Verstegen, M.M., Howe, S.J., Arens, A., Ott, M.G., Hoelzer, D., Seger, R., *et al.* (2011). Insertion sites in engrafted cells cluster within a limited repertoire of genomic areas after gammaretroviral vector gene therapy. *Mol Ther* 19, 2031-2039.
- Deichmann, A., Hacein-Bey-Abina, S., Schmidt, M., Garrigue, A., Brugman, M.H., Hu, J., Glimm, H., Gyapay, G., Prum, B., Fraser, C.C., *et al.* (2007). Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J Clin Invest* 117, 2225-2232.
- Dorsman, J.C., Levitus, M., Rockx, D., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Haitjema, A., Bakker, S.T., Steltenpool, J., Schuler, D., Mohan, S., *et al.* (2007). Identification of the Fanconi anemia complementation group I gene, FANCI. *Cell Oncol* 29, 211-218.
- Dunbar, C.E., Cottler-Fox, M., O'Shaughnessy, J.A., Doren, S., Carter, C., Berenson, R., Brown, S., Moen, R.C., Greenblatt, J., Stewart, F.M., *et al.* (1995). Retrovirally marked CD34-enriched peripheral blood and bone marrow cells contribute to long-term engraftment after autologous transplantation. *Blood* 85, 3048-3057.
- Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2007). Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. *J Gene Med* 9, 833-842.
- ESGCT (2006). One of three successfully treated CGD patients in a Swiss-German gene therapy trial died due to his underlying disease: A position statement from the European Society of Gene Therapy (ESGT). *J Gene Med* 8, 1435.

EU/3/10/822, Testori Coggi, P., and COMISION, E. (2010). Declaración del medicamento "Vector lentiviral conteniendo el gen de la anemia de Fanconi A (FANCA)" como medicamento huérfano con arreglo al Reglamento (CE) n° 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo. In Paola EMA, ed. (European Comision).

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Evers, B., and Jonkers, J. (2006). Mouse models of BRCA1 and BRCA2 deficiency: past lessons, current understanding and future prospects. *Oncogene* 25, 5885-5897.

FA-consortium, and consortium, F.A.B.C. (1996). Positional cloning of the Fanconi anaemia group A gene. *Nat Genet* 14, 324-328.

Fanconi, G. (1927). Familiäre infantile perniziosaartige Anämie (perniciöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und Erziehung (Wien)* 117, 257-280.

Fehse, B., and Roeder, I. (2008). Insertional mutagenesis and clonal dominance: biological and statistical considerations. *Gene Ther* 15, 143-153.

Fong, Y.W., Inouye, C., Yamaguchi, T., Cattoglio, C., Grubisic, I., and Tjian, R. (2011). A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells. *Cell* 147, 120-131.

Ford, C.E., Hamerton, J.L., Barnes, D.W., and Loutit, J.F. (1956). Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature* 177, 452-454.

Forman, J., Taruscio, D., Llera, V.A., Barrera, L.A., Cote, T.R., Edfjall, C., Gavhed, D., Haffner, M.E., Nishimura, Y., Posada, M., *et al.* (2012). The need for worldwide policy and action plans for rare diseases. *Acta Paediatr* 101, 805-807.

Forsberg, E.C., Serwold, T., Kogan, S., Weissman, I.L., and Passegue, E. (2006). New evidence supporting megakaryocyte-erythrocyte potential of flk2/flt3+ multipotent hematopoietic progenitors. *Cell* 126, 415-426.

Franco, S., Murphy, M.M., Li, G., Borjeson, T., Boboila, C., and Alt, F.W. (2008). DNA-PKcs and Artemis function in the end-joining phase of immunoglobulin heavy chain class switch recombination. *J Exp Med* 205, 557-564.

Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Amirache, F., Trono, D., Rio, P., Bueren, J., Cosset, F.L., and Verhoeven, E. (2012). A novel lentiviral vector targets gene transfer into human hematopoietic stem cells in marrow from patients with bone marrow failure syndrome and in vivo in humanized mice. *Blood* 119, 1139-1150.

Fulop, G.M., and Phillips, R.A. (1990). The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347, 479-482.

Gabriel, R., Eckenberg, R., Paruzynski, A., Bartholomae, C.C., Nowrouzi, A., Arens, A., Howe, S.J., Recchia, A., Cattoglio, C., Wang, W., *et al.* (2009). Comprehensive genomic access to vector integration in clinical gene therapy. *Nat Med* 15, 1431-1436.

Gallay, P., Swingle, S., Aiken, C., and Trono, D. (1995). HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* 80, 379-388.

Gaspar, H.B., Björkstrand, E., Parsley, K., Gilmour, K.C., King, D., Sinclair, J., Zhang, F., Giannakopoulos, A., Adams, S., Fairbanks, L.D., *et al.* (2006). Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther* 14, 505-513.

Gaspar, H.B., Parsley, K.L., Howe, S., King, D., Gilmour, K.C., Sinclair, J., Brouns, G., Schmidt, M., Von Kalle, C., Barington, T., *et al.* (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364, 2181-2187.

Gilley, D., Tanaka, H., Hande, M.P., Kurimasa, A., Li, G.C., Oshimura, M., and Chen, D.J. (2001). DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15084-15088.

Ginn, S.L., Alexander, I.E., Edelstein, M.L., Abedi, M.R., and Wixon, J. (2013). Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. *J Gene Med* 15, 65-77.

Ginn, S.L., Curtin, J.A., Kramer, B., Smyth, C.M., Wong, M., Kakakios, A., McCowage, G.B., Watson, D., Alexander, S.I., Latham, M., *et al.* (2005). Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia. *Med J Aust* 182, 458-463.

Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-1133.

Gonzalez-Murillo, A., Lozano, M.L., Alvarez, L., Jacome, A., Almarza, E., Navarro, S., Segovia, J.C., Hanenberg, H., Guenechea, G., Bueren, J.A., *et al.* (2010). Development of lentiviral vectors with optimized transcriptional activity for the gene therapy of patients with Fanconi anemia. *Hum Gene Ther* 21, 623-630.

Gonzalez-Murillo, A., Lozano, M.L., Montini, E., Bueren, J.A., and Guenechea, G. (2008). Unaltered repopulation properties of mouse hematopoietic stem cells transduced with lentiviral vectors. *Blood* 112, 3138-3147.

Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Harer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., *et al.* (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J* 25, 3880-3889.

Goodell, M.A., McKinney-Freeman, S., and Camargo, F.D. (2005). Isolation and characterization of side population cells. *Methods Mol Biol* 290, 343-352.

Gordon, M.Y., Lewis, J.L., and Marley, S.B. (2002). Of mice and men...and elephants. *Blood* 100, 4679-4680.

Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., *et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63-67.

Goytisolo, F.A., Samper, E., Edmonson, S., Taccioli, G.E., and Blasco, M.A. (2001). The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Mol Cell Biol* 21, 3642-3651.

- Gregory, C.J., and Eaves, A.C. (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 51, 527-537.
- Gregory, T.R. (2012). Animal Genome Size Database.
- Grewal, S.S., Kahn, J.P., MacMillan, M.L., Ramsay, N.K., and Wagner, J.E. (2004). Successful hematopoietic stem cell transplantation for Fanconi anemia from an unaffected HLA-genotype-identical sibling selected using preimplantation genetic diagnosis. *Blood* 103, 1147-1151.
- Gross, M., Hanenberg, H., Lobitz, S., Friedl, R., Herterich, S., Dietrich, R., Gruhn, B., Schindler, D., and Hoehn, H. (2002). Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 98, 126-135.
- Guardiola, P., Pasquini, R., Dokal, I., Ortega, J.J., van Weel-Sipman, M., Marsh, J.C., Ball, S.E., Locatelli, F., Vermylen, C., Skinner, R., *et al.* (2000). Outcome of 69 allogeneic stem cell transplantations for Fanconi anemia using HLA-matched unrelated donors: a study on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 95, 422-429.
- Guenechea, G., Gan, O.I., Dorrell, C., and Dick, J.E. (2001). Distinct classes of human stem cells that differ in proliferative and self-renewal potential. *Nat Immunol* 2, 75-82.
- Gurdon, J.B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* 4, 256-273.
- Gush, K.A., Fu, K.L., Grompe, M., and Walsh, C.E. (2000). Phenotypic correction of Fanconi anemia group C knockout mice. *Blood* 95, 700-704.
- Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C.D., Buzney, E.A., Khan, M.K., Flint, A.F., Kunkel, L.M., and Mulligan, R.C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.
- Hacein-Bey-Abina, S., Garrigue, A., Wang, G.P., Soulier, J., Lim, A., Morillon, E., Clappier, E., Caccavelli, L., Delabesse, E., Beldjord, K., *et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest* 118, 3132-3142.
- Hacein-Bey-Abina, S., Le Deist, F., Carlier, F., Bouneaud, C., Hue, C., De Villartay, J.P., Thrasher, A.J., Wulffraat, N., Sorensen, R., Dupuis-Girod, S., *et al.* (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 346, 1185-1193.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., *et al.* (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Hackett, P.B., Largaespada, D.A., and Cooper, L.J. (2010). A transposon and transposase system for human application. *Mol Ther* 18, 674-683.
- Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 331-341.
- Hammarsten, O., DeFazio, L.G., and Chu, G. (2000). Activation of DNA-dependent protein kinase by single-stranded DNA ends. *J Biol Chem* 275, 1541-1550.
- Hande, P., Slijepcevic, P., Silver, A., Bouffler, S., van Buul, P., Bryant, P., and Landsdorp, P. (1999). Elongated telomeres in scid mice. *Genomics* 56, 221-223.
- Heckl, D., Schwarzer, A., Haemmerle, R., Steinemann, D., Rudolph, C., Skawran, B., Knoess, S., Krause, J., Li, Z., Schlegelberger, B., *et al.* (2012). Lentiviral vector induced insertional haploinsufficiency of Ebf1 causes murine leukemia. *Mol Ther* 20, 1187-1195.
- Hirata, R.K., Miller, A.D., Andrews, R.G., and Russell, D.W. (1996). Transduction of hematopoietic cells by foamy virus vectors. *Blood* 88, 3654-3661.
- Houghtaling, S., Timmers, C., Noll, M., Finegold, M.J., Jones, S.N., Meyn, M.S., and Grompe, M. (2003). Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice. *Genes Dev* 17, 2021-2035.
- Howe, S.J., Mansour, M.R., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Hubank, M., Kempinski, H., Brugman, M.H., Pike-Overzet, K., Chatters, S.J., de Ridder, D., *et al.* (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 118, 3143-3150.
- Howlett, N.G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., Persky, N., Grompe, M., Joenje, H., Pals, G., *et al.* (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297, 606-609.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C., *et al.* (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58-62.
- IHGSC (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
- Ivics, Z., Hackett, P.B., Plasterk, R.H., and Izsvak, Z. (1997). Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* 91, 501-510.
- Ivics, Z., and Izsvak, Z. (2011). Nonviral gene delivery with the sleeping beauty transposon system. *Hum Gene Ther* 22, 1043-1051.
- Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107, 1395-1402.
- Jackson, K.A., Mi, T., and Goodell, M.A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14482-14486.
- Jacobs, J.J., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 14, 2302-2308.

- Jacome, A., Navarro, S., Rio, P., Yanez, R.M., Gonzalez-Murillo, A., Lozano, M.L., Lamana, M.L., Sevilla, J., Olive, T., Diaz-Heredia, C., *et al.* (2009). Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients. *Mol Ther* 17, 1083-1092.
- Jones, R.J., Wagner, J.E., Celano, P., Zicha, M.S., and Sharkis, S.J. (1990). Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* 347, 188-189.
- Jordan, C.T., and Lemischka, I.R. (1990). Clonal and systemic analysis of long-term hematopoiesis in the mouse. *Genes Dev* 4, 220-232.
- Jovanovic, M., and Dynan, W.S. (2006). Terminal DNA structure and ATP influence binding parameters of the DNA-dependent protein kinase at an early step prior to DNA synapsis. *Nucleic Acids Res* 34, 1112-1120.
- Kajiwara, M., Aoi, T., Okita, K., Takahashi, R., Inoue, H., Takayama, N., Endo, H., Eto, K., Toguchida, J., Uemoto, S., *et al.* (2012). Donor-dependent variations in hepatic differentiation from human-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 12538-12543.
- Kamel-Reid, S., and Dick, J.E. (1988). Engraftment of immune-deficient mice with human hematopoietic stem cells. *Science* 242, 1706-1709.
- Kashishian, A., Douangpanya, H., Clark, D., Schlachter, S.T., Eary, C.T., Schiro, J.G., Huang, H., Burgess, L.E., Kesicki, E.A., and Halbrook, J. (2003). DNA-dependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer. *Mol Cancer Ther* 2, 1257-1264.
- Kasid, A., Morecki, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Culver, K., Freeman, S., Director, E., Lotze, M.T., Blaese, R.M., Anderson, W.F., *et al.* (1990). Human gene transfer: characterization of human tumor-infiltrating lymphocytes as vehicles for retroviral-mediated gene transfer in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 473-477.
- Kee, Y., and D'Andrea, A.D. (2012). Molecular pathogenesis and clinical management of Fanconi anemia. *J Clin Invest* 122, 3799-3806.
- Kelly, P.F., Radtke, S., von Kalle, C., Balcik, B., Bohn, K., Mueller, R., Schuesler, T., Haren, M., Reeves, L., Cancelas, J.A., *et al.* (2007). Stem cell collection and gene transfer in Fanconi anemia. *Mol Ther* 15, 211-219.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285-290.
- Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, H., Loh, Y.H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., *et al.* (2011a). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 1117-1119.
- Kim, Y., Lach, F.P., Desetty, R., Hanenberg, H., Auerbach, A.D., and Smogorzewska, A. (2011b). Mutations of the SLX4 gene in Fanconi anemia. *Nat Genet*.
- Kinoshita, T., Nagamatsu, G., Kosaka, T., Takubo, K., Hotta, A., Ellis, J., and Suda, T. (2011). Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407, 321-326.
- Kohn, D.B., Weinberg, K.I., Nolte, J.A., Heiss, L.N., Lenarsky, C., Crooks, G.M., Hanley, M.E., Annett, G., Brooks, J.S., el-Khoureiy, A., *et al.* (1995). Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med* 1, 1017-1023.
- Koomen, M., Cheng, N.C., van de Vrugt, H.J., Godthelp, B.C., van der Valk, M.A., Oostra, A.B., Zdzienicka, M.Z., Joenje, H., and Arwert, F. (2002). Reduced fertility and hypersensitivity to mitomycin C characterize Fancg/Xrcc9 null mice. *Hum Mol Genet* 11, 273-281.
- Krause, D.S., Theise, N.D., Collector, M.I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S.J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.
- Kues, W.A., Herrmann, D., Barg-Kues, B., Haridoss, S., Nowak-Imialek, M., Buchholz, T., Streeck, M., Grebe, A., Grabundzija, I., Merkert, S., *et al.* (2012). Derivation and characterization of sleeping beauty transposon-mediated porcine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 22, 124-135.
- Kuhn, A., Gottlieb, T.M., Jackson, S.P., and Grummt, I. (1995). DNA-dependent protein kinase: a potent inhibitor of transcription by RNA polymerase I. *Genes Dev* 9, 193-203.
- Kurimasa, A., Kumano, S., Boubnov, N.V., Story, M.D., Tung, C.S., Peterson, S.R., and Chen, D.J. (1999). Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol Cell Biol* 19, 3877-3884.
- Kustikova, O.S., Geiger, H., Li, Z., Brugman, M.H., Chambers, S.M., Shaw, C.A., Pike-Overzet, K., Ridder, D., Staal, F.J., Keudell, G., *et al.* (2007). Retroviral vector insertion sites associated with dominant hematopoietic clones mark "stemness" pathways. *Blood* 109, 1897-1907.
- Kuznetsov, S., Pellegrini, M., Shuda, K., Fernandez-Capetillo, O., Liu, Y., Martin, B.K., Burkett, S., Southon, E., Pati, D., Tassarollo, L., *et al.* (2007). RAD51C deficiency in mice results in early prophase I arrest in males and sister chromatid separation at metaphase II in females. *J Cell Biol* 176, 581-592.
- Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I.L., and Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234.
- Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J.C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X.L., Kato, I., *et al.* (1996). Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy. *Nat Med* 2, 1329-1337.

- Laterveer, L., Lindley, I.J., Hamilton, M.S., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (1995). Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 85, 2269-2275.
- Laufs, S., Guenechea, G., Gonzalez-Murillo, A., Zsuzsanna Nagy, K., Luz Lozano, M., del Val, C., Jonnakuty, S., Hotz-Wagenblatt, A., Jens Zeller, W., Bueren, J.A., *et al.* (2006). Lentiviral vector integration sites in human NOD/SCID repopulating cells. *J Gene Med* 8, 1197-1207.
- Leavitt, A.D., Robles, G., Alesandro, N., and Varmus, H.E. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain in vitro integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection. *J Virol* 70, 721-728.
- Leboulch, P. (2013). Gene therapy: primed for take-off. *Nature* 500, 280-282.
- Lemieux, M.E., Rebel, V.I., Lansdorp, P.M., and Eaves, C.J. (1995). Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow "switch" cultures. *Blood* 86, 1339-1347.
- Levitus, M., Waisfisz, Q., Godthelp, B.C., de Vries, Y., Hussain, S., Wiegant, W.W., Elghalbzouri-Maghrani, E., Steltenpool, J., Rooimans, M.A., Pals, G., *et al.* (2005). The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J. *Nat Genet* 37, 934-935.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Canamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460, 1136-1139.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., *et al.* (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 296, 497.
- Liu, J.M., Kim, S., Read, E.J., Futaki, M., Dokal, I., Carter, C.S., Leitman, S.F., Pensiero, M., Young, N.S., and Walsh, C.E. (1999). Engraftment of hematopoietic progenitor cells transduced with the Fanconi anemia group C gene (FANCC). *Hum Gene Ther* 10, 2337-2346.
- Liu, J.M., Young, N.S., Walsh, C.E., Cottler-Fox, M., Carter, C., Dunbar, C., Barrett, A.J., and Emmons, R. (1997). Retroviral mediated gene transfer of the Fanconi anemia complementation group C gene to hematopoietic progenitors of group C patients. *Hum Gene Ther* 8, 1715-1730.
- Lo Ten Foe, J.R., Rooimans, M.A., Bosnoyan-Collins, L., Alon, N., Wijker, M., Parker, L., Lightfoot, J., Carreau, M., Callen, D.F., Savoia, A., *et al.* (1996). Expression cloning of a cDNA for the major Fanconi anaemia gene, FAA. *Nat Genet* 14, 320-323.
- Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C.M., Colleoni, S., Lee, Y.L., Kim, K.A., Ando, D., Urnov, F.D., Galli, C., Gregory, P.D., *et al.* (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25, 1298-1306.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V (D)J recombination. *Cell* 108, 781-794.
- Ma, Y., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2005). The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)* 4, 845-851.
- MacMillan, M.L., Walters, M.C., and Gluckman, E. (2010). Transplant outcomes in bone marrow failure syndromes and hemoglobinopathies. *Semin Hematol* 47, 37-45.
- Maetzig, T., Brugman, M.H., Bartels, S., Heinz, N., Kustikova, O.S., Modlich, U., Li, Z., Galla, M., Schiedlmeier, B., Schambach, A., *et al.* (2011). Polyclonal fluctuation of lentiviral vector-transduced and expanded murine hematopoietic stem cells. *Blood* 117, 3053-3064.
- Maetzig, T., Galla, M., Brugman, M.H., Loew, R., Baum, C., and Schambach, A. (2010). Mechanisms controlling titer and expression of bidirectional lentiviral and gammaretroviral vectors. *Gene Ther* 17, 400-411.
- Maggio-Price, L., Wolf, N.S., Priestley, G.V., Pietrzyk, M.E., and Bernstein, S.E. (1988). Evaluation of stem cell reserve using serial bone marrow transplantation and competitive repopulation in a murine model of chronic hemolytic anemia. *Exp Hematol* 16, 653-659.
- Mann, R., Mulligan, R.C., and Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* 33, 153-159.
- Mantovani, J., Charrier, S., Eckenberg, R., Saurin, W., Danos, O., Perea, J., and Galy, A. (2009). Diverse genomic integration of a lentiviral vector developed for the treatment of Wiskott-Aldrich syndrome. *J Gene Med* 11, 645-654.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149-1153.
- Marshall, E. (1999). Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 286, 2244-2245.
- Martin, G.M., Sprague, C.A., and Epstein, C.J. (1970). Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype. *Lab Invest* 23, 86-92.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- Martinez, A., Hinz, J.M., Gomez, L., Molina, B., Acuna, H., Jones, I.M., Frias, S., and Coleman, M.A. (2008). Differential expression of TP53 associated genes in Fanconi anemia cells after mitomycin C and hydroxyurea treatment. *Mutat Res* 656, 1-7.

- Mashimo, T., Takizawa, A., Kobayashi, J., Kunihiro, Y., Yoshimi, K., Ishida, S., Tanabe, K., Yanagi, A., Tachibana, A., Hirose, J., *et al.* (2012). Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Rep* 2, 685-694.
- Mates, L., Chuah, M.K., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., Grzela, D.P., Schmitt, A., Becker, K., Matrai, J., *et al.* (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet* 41, 753-761.
- McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M., and Weissman, I.L. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241, 1632-1639.
- McLeod, D.L., Shreve, M.M., and Axelrad, A.A. (1976). Induction of megakaryocyte colonies with platelet formation in vitro. *Nature* 261, 492-494.
- Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell* 86, 897-906.
- Meetei, A.R., de Winter, J.P., Medhurst, A.L., Wallisch, M., Waisfisz, Q., van de Vrugt, H.J., Oostra, A.B., Yan, Z., Ling, C., Bishop, C.E., *et al.* (2003). A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. *Nat Genet* 35, 165-170.
- Meetei, A.R., Levitus, M., Xue, Y., Medhurst, A.L., Zwaan, M., Ling, C., Rooimans, M.A., Bier, P., Hoatlin, M., Pals, G., *et al.* (2004). X-linked inheritance of Fanconi anemia complementation group B. *Nat Genet* 36, 1219-1224.
- Meetei, A.R., Medhurst, A.L., Ling, C., Xue, Y., Singh, T.R., Bier, P., Steltenpool, J., Stone, S., Dokal, I., Mathew, C.G., *et al.* (2005). A human ortholog of archaeal DNA repair protein Hef is defective in Fanconi anemia complementation group M. *Nat Genet* 37, 958-963.
- Metcalf, D. (1989). The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* 339, 27-30.
- Metcalf, D., MacDonald, H.R., Odartchenko, N., and Sordat, B. (1975). Growth of mouse megakaryocyte colonies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1744-1748.
- Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., Petti, S., Mavilio, F., Russo, G., Lazzaro, D., Testa, U., Marinucci, M., and Peschle, C. (1986). Human embryonic hemopoiesis. Kinetics of progenitors and precursors underlying the yolk sac----liver transition. *J Clin Invest* 78, 51-60.
- Modlich, U., Bohne, J., Schmidt, M., von Kalle, C., Knoss, S., Schambach, A., and Baum, C. (2006). Cell-culture assays reveal the importance of retroviral vector design for insertional genotoxicity. *Blood* 108, 2545-2553.
- Modlich, U., Kustikova, O.S., Schmidt, M., Rudolph, C., Meyer, J., Li, Z., Kamino, K., von Neuhoff, N., Schlegelberger, B., Kuehlicke, K., *et al.* (2005). Leukemias following retroviral transfer of multidrug resistance 1 (MDR1) are driven by combinatorial insertional mutagenesis. *Blood* 105, 4235-4246.
- Modlich, U., Navarro, S., Zychlinski, D., Maetzig, T., Knoess, S., Brugman, M.H., Schambach, A., Charrier, S., Galy, A., Thrasher, A.J., *et al.* (2009). Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther* 17, 1919-1928.
- Modlich, U., Schambach, A., Brugman, M.H., Wicke, D.C., Knoess, S., Li, Z., Maetzig, T., Rudolph, C., Schlegelberger, B., and Baum, C. (2008). Leukemia induction after a single retroviral vector insertion in Evi1 or Prdm16. *Leukemia* 22, 1519-1528.
- Moiani, A., Paleari, Y., Sartori, D., Mezzadra, R., Miccio, A., Cattoglio, C., Cocchiarella, F., Lidonnici, M.R., Ferrari, G., and Mavilio, F. (2012). Lentiviral vector integration in the human genome induces alternative splicing and generates aberrant transcripts. *J Clin Invest* 122, 1653-1666.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C.C., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi, L.S., Ambrosi, A., Ponzoni, M., *et al.* (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest* 119, 964-975.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., Sergi, L., Benedicenti, F., Ambrosi, A., Di Serio, C., *et al.* (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol* 24, 687-696.
- Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 35-71.
- Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M., and Wilson, D.B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335, 256-259.
- Mueller, P.R., and Wold, B. (1989). In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* 246, 780-786.
- Muenthaisong, S., Ujhelly, O., Polgar, Z., Varga, E., Ivics, Z., Pirity, M.K., and Dinnyes, A. (2012). Generation of mouse induced pluripotent stem cells from different genetic backgrounds using Sleeping beauty transposon mediated gene transfer. *Exp Cell Res*.
- Muller, L.U., Milsom, M.D., Harris, C.E., Vyas, R., Brumme, K.M., Parmar, K., Moreau, L.A., Schambach, A., Park, I.H., London, W.B., *et al.* (2012). Overcoming reprogramming resistance of Fanconi anemia cells. *Blood* 119, 5449-5457.
- Muul, L.M., Tuschong, L.M., Soenen, S.L., Jagadeesh, G.J., Ramsey, W.J., Long, Z., Carter, C.S., Garabedian, E.K., Alleyne, M., Brown, M., *et al.* (2003). Persistence and expression of the adenosine deaminase gene for 12 years and immune reaction to gene transfer components: long-term results of the first clinical gene therapy trial. *Blood* 101, 2563-2569.

- Naka, K., Muraguchi, T., Hoshii, T., and Hirao, A. (2008). Regulation of reactive oxygen species and genomic stability in hematopoietic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 10, 1883-1894.
- Nakano, T., Kodama, H., and Honjo, T. (1994). Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265, 1098-1101.
- Nakayama, M. (2010). Homologous recombination in human iPS and ES cells for use in gene correction therapy. *Drug Discov Today* 15, 198-202.
- Nakeff, A., and Daniels-McQueen, S. (1976). In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M). *Proc Soc Exp Biol Med* 151, 587-590.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267.
- Navarro, S., Meza, N.W., Quintana-Bustamante, O., Casado, J.A., Jacome, A., McAllister, K., Puerto, S., Surrallés, J., Segovia, J.C., and Bueren, J.A. (2006). Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* 14, 525-535.
- Navarro, S., Moleiro, V., Molina-Estévez, J., Lozano, M., Chinchón, R., Almarza, A., Quintana-Bustamante, O., Mostoslavsky, G., Maetzig, T., Galla, M., *et al.* (2013). Generation of iPSCs from genetically corrected Brca2 Hypomorphic Cells: Implications in Cell Reprogramming and Stem Cell Therapy. *Stem Cells Accepted*.
- Nicklas, W., Baneux, P., Boot, R., Decelle, T., Deeny, A.A., Fumanelli, M., and Illgen-Wilcke, B. (2002). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab Anim* 36, 20-42.
- Nienhuis, A.W., Dunbar, C.E., and Sorrentino, B.P. (2006). Genotoxicity of retroviral integration in hematopoietic cells. *Mol Ther* 13, 1031-1049.
- Niewolik, D., Pannicke, U., Lu, H., Ma, Y., Wang, L.C., Kulesza, P., Zandi, E., Lieber, M.R., and Schwarz, K. (2006). DNA-PKcs dependence of Artemis endonucleolytic activity, differences between hairpins and 5' or 3' overhangs. *J Biol Chem* 281, 33900-33909.
- Nitta, E., Yamashita, M., Hosokawa, K., Xian, M., Takubo, K., Arai, F., Nakada, S., and Suda, T. (2011). Telomerase reverse transcriptase protects ATM-deficient hematopoietic stem cells from ROS-induced apoptosis through a telomere-independent mechanism. *Blood* 117, 4169-4180.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
- Noll, M., Battaile, K.P., Bateman, R., Lax, T.P., Rathbun, K., Reifsteck, C., Bagby, G., Finegold, M., Olson, S., and Grompe, M. (2002). Fanconi anemia group A and C double-mutant mice: functional evidence for a multi-protein Fanconi anemia complex. *Exp Hematol* 30, 679-688.
- Nsair, A., and MacLellan, W.R. (2011). Induced pluripotent stem cells for regenerative cardiovascular therapies and biomedical discovery. *Adv Drug Deliv Rev* 63, 324-330.
- Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407, 313-319.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949-953.
- Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631-644.
- Ott, M.G., Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Stein, S., Siler, U., Koehl, U., Glimm, H., Kuhlcke, K., Schilz, A., Kunkel, H., *et al.* (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat Med* 12, 401-409.
- Palacios, R., Golunski, E., and Samaridis, J. (1995). In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7530-7534.
- Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D., and Soutoglou, E. (2012). DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol* 19, 276-282.
- Papapetrou, E.P. (2012). FA iPS: correction or reprogramming first? *Blood* 119, 5341-5342.
- Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.
- Parmar, K., Kim, J., Sykes, S.M., Shimamura, A., Stuckert, P., Zhu, K., Hamilton, A., Deloach, M.K., Kutok, J.L., Akashi, K., *et al.* (2010). Hematopoietic stem cell defects in mice with deficiency of Fancd2 or Usp1. *Stem Cells* 28, 1186-1195.
- Paruzynski, A., Arens, A., Gabriel, R., Bartholomae, C.C., Scholz, S., Wang, W., Wolf, S., Glimm, H., Schmidt, M., and von Kalle, C. (2010). Genome-wide high-throughput integrome analyses by nrLAM-PCR and next-generation sequencing. *Nat Protoc* 5, 1379-1395.
- Pera, M.F. (2011). Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature* 471, 46-47.
- Pereira, C.F., Terranova, R., Ryan, N.K., Santos, J., Morris, K.J., Cui, W., Merckenschlager, M., and Fisher, A.G. (2008). Heterokaryon-based reprogramming of human B lymphocytes for pluripotency requires Oct4 but not Sox2. *PLoS Genet* 4, e1000170.
- Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.L., *et al.* (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 26, 808-816.

- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., and Goff, J.P. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170.
- Phillips, R.A., Jewett, M.A., and Gallie, B.L. (1989). Growth of human tumors in immune-deficient scid mice and nude mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 152, 259-263.
- Ploemacher, R.E., van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S., and Brons, N.H. (1989). An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 74, 2755-2763.
- Pluznik, D.H., and Sachs, L. (1965). The cloning of normal "mast" cells in tissue culture. *J Cell Physiol* 66, 319-324.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., *et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28, 848-855.
- Qing, Y., Lin, Y., and Gerson, S.L. (2012). An intrinsic BM hematopoietic niche occupancy defect of HSC in scid mice facilitates exogenous HSC engraftment. *Blood* 119, 1768-1771.
- Quintana-Bustamante, O., Grueso, E., Garcia-Escudero, R., Arza, E., Alvarez-Barrientos, A., Fabregat, I., Garcia-Bravo, M., Meza, N.W., and Segovia, J.C. (2012). Cell fusion reprogramming leads to a specific hepatic expression pattern during mouse bone marrow derived hepatocyte formation in vivo. *PLoS One* 7, e33945.
- Rani, R., Li, J., and Pang, Q. (2008). Differential p53 engagement in response to oxidative and oncogenic stresses in Fanconi anemia mice. *Cancer Res* 68, 9693-9702.
- Rantakari, P., Nikkila, J., Jokela, H., Ola, R., Pylkas, K., Lagerbohm, H., Sainio, K., Poutanen, M., and Winqvist, R. (2010). Inactivation of Palb2 gene leads to mesoderm differentiation defect and early embryonic lethality in mice. *Hum Mol Genet* 19, 3021-3029.
- Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M.J., Consiglio, A., Castella, M., Rio, P., Sleep, E., *et al.* (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460, 53-59.
- Raya, A., Rodriguez-Piza, I., Navarro, S., Richaud-Patin, Y., Guenechea, G., Sanchez-Danes, A., Consiglio, A., Bueren, J., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells. *Nat Protoc* 5, 647-660.
- Reid, S., Schindler, D., Hanenberg, H., Barker, K., Hanks, S., Kalb, R., Neveling, K., Kelly, P., Seal, S., Freund, M., *et al.* (2006). Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet*.
- Reiser, J., Harmison, G., Kluepfel-Stahl, S., Brady, R.O., Karlsson, S., and Schubert, M. (1996). Transduction of nondividing cells using pseudotyped defective high-titer HIV type 1 particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15266-15271.
- Rio, P., Segovia, J.C., Hanenberg, H., Casado, J.A., Martinez, J., Gottsche, K., Cheng, N.C., Van de Vrugt, H.J., Arwert, F., Joenje, H., *et al.* (2002). In vitro phenotypic correction of hematopoietic progenitors from Fanconi anemia group A knockout mice. *Blood* 100, 2032-2039.
- Ronen, K., Negre, O., Roth, S., Colomb, C., Malani, N., Denaro, M., Brady, T., Fusil, F., Gillet-Legrand, B., Hehir, K., *et al.* (2011). Distribution of Lentiviral Vector Integration Sites in Mice Following Therapeutic Gene Transfer to Treat beta-thalassemia. *Mol Ther* 19, 1273-1286.
- Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., *et al.* (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med* 323, 570-578.
- Russell, D.W., and Miller, A.D. (1996). Foamy virus vectors. *J Virol* 70, 217-222.
- Samper, E., Goytisolo, F.A., Slijepcevic, P., van Buul, P.P., and Blasco, M.A. (2000). Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* 1, 244-252.
- Sanchez, M.J., Holmes, A., Miles, C., and Dzierzak, E. (1996). Characterization of the first definitive hematopoietic stem cells in the AGM and liver of the mouse embryo. *Immunity* 5, 513-525.
- Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchison, C.A., Slocumbe, P.M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Scaramuzza, S., Biasco, L., Ripamonti, A., Castiello, M.C., Loperfido, M., Draghici, E., Hernandez, R.J., Benedicenti, F., Radrizzani, M., Salomoni, M., *et al.* (2012). Preclinical Safety and Efficacy of Human CD34 (+) Cells Transduced With Lentiviral Vector for the Treatment of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Mol Ther*.
- Schambach, A., Bohne, J., Baum, C., Hermann, F.G., Egerer, L., von Laer, D., and Giroglou, T. (2006). Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promoter sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther* 13, 641-645.
- Scheckenbach, K., Morgan, M., Filger-Brillinger, J., Sandmann, M., Strimling, B., Scheurlen, W., Schindler, D., Gobel, U., and Hanenberg, H. (2012). Treatment of the bone marrow failure in Fanconi anemia patients with danazol. *Blood Cells Mol Dis* 48, 128-131.
- Schmidt, M., Carbonaro, D.A., Speckmann, C., Wissler, M., Bohnsack, J., Elder, M., Aronow, B.J., Nolte, J.A., Kohn, D.B., and von Kalle, C. (2003). Clonality analysis after retroviral-mediated gene transfer to CD34+ cells from the cord blood of ADA-deficient SCID neonates. *Nat Med* 9, 463-468.

- Schmidt, M., Hoffmann, G., Wissler, M., Lemke, N., Mussig, A., Glimm, H., Williams, D.A., Ragg, S., Hesemann, C.U., and von Kalle, C. (2001). Detection and direct genomic sequencing of multiple rare unknown flanking DNA in highly complex samples. *Hum Gene Ther* 12, 743-749.
- Schmidt, M., Schwarzwaelder, K., Bartholomae, C., Zaoui, K., Ball, C., Pilz, I., Braun, S., Glimm, H., and von Kalle, C. (2007). High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR). *Nat Methods* 4, 1051-1057.
- Schmidt, M., Zickler, P., Hoffmann, G., Haas, S., Wissler, M., Muessig, A., Tisdale, J.F., Kuramoto, K., Andrews, R.G., Wu, T., *et al.* (2002). Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood* 100, 2737-2743.
- Schwarzwaelder, K., Howe, S.J., Schmidt, M., Brugman, M.H., Deichmann, A., Glimm, H., Schmidt, S., Prinz, C., Wissler, M., King, D.J., *et al.* (2007). Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J Clin Invest* 117, 2241-2249.
- Selleri, C., Maciejewski, J.P., De Rosa, G., Raiola, A., Risitano, A.M., Picardi, M., Pezzullo, L., Luciano, L., Ricci, P., Varriale, G., *et al.* (1999). Long-lasting decrease of marrow and circulating long-term culture initiating cells after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 23, 1029-1037.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.
- Sherwood, S.W., Rush, D., Ellsworth, J.L., and Schimke, R.T. (1988). Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9086-9090.
- Silver, J., and Keerikatte, V. (1989). Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J Virol* 63, 1924-1928.
- Sipley, J.D., Menninger, J.C., Hartley, K.O., Ward, D.C., Jackson, S.P., and Anderson, C.W. (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7515-7519.
- Smeenk, G., de Groot, A.J., Romeijn, R.J., van Buul, P.P., Zdzienicka, M.Z., Mullenders, L.H., Pastink, A., and Godthelp, B.C. (2010). Rad51C is essential for embryonic development and haploinsufficiency causes increased DNA damage sensitivity and genomic instability. *Mutat Res* 689, 50-58.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., *et al.* (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964-977.
- Somers, A., Jean, J.C., Sommer, C.A., Omari, A., Ford, C.C., Mills, J.A., Ying, L., Sommer, A.G., Jean, J.M., Smith, B.W., *et al.* (2010). Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28, 1728-1740.
- Sommer, C.A., Sommer, A.G., Longmire, T.A., Christodoulou, C., Thomas, D.D., Gostissa, M., Alt, F.W., Murphy, G.J., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* 28, 64-74.
- Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 27, 543-549.
- Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364-377.
- Stocking, C., Loliger, C., Kawai, M., Suci, S., Gough, N., and Ostertag, W. (1988). Identification of genes involved in growth autonomy of hematopoietic cells by analysis of factor-independent mutants. *Cell* 53, 869-879.
- Strathdee, C.A., Gavish, H., Shannon, W.R., and Buchwald, M. (1992). Cloning of cDNAs for Fanconi's anaemia by functional complementation. *Nature* 356, 763-767.
- Suerth, J.D., Maetzig, T., Brugman, M.H., Heinz, N., Appelt, J.U., Kaufmann, K.B., Schmidt, M., Grez, M., Modlich, U., Baum, C., *et al.* (2012). Alpharetroviral self-inactivating vectors: long-term transgene expression in murine hematopoietic cells and low genotoxicity. *Mol Ther* 20, 1022-1032.
- Suerth, J.D., Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., and Schambach, A. (2010). Self-inactivating alpharetroviral vectors with a split-packaging design. *J Virol* 84, 6626-6635.
- Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S.C., and Surani, M.A. (1997). Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J* 16, 6510-6520.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D.M., Nakano, Y., Meyer, E.M., Morel, L., Petersen, B.E., and Scott, E.W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416, 542-545.
- Theise, N.D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J.M., and Krause, D.S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31, 235-240.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

- Thornley, I., Sutherland, D.R., Nayar, R., Sung, L., Freedman, M.H., and Messner, H.A. (2001). Replicative stress after allogeneic bone marrow transplantation: changes in cycling of CD34+CD90+ and CD34+CD90- hematopoietic progenitors. *Blood* 97, 1876-1878.
- Tilgner, K., Neganova, I., Moreno-Gimeno, I., Al-Aama, J.Y., Burks, D., Yung, S., Singhapol, C., Saretzki, G., Evans, J., Gorbunova, V., *et al.* (2013a). A human iPSC model of Ligase IV deficiency reveals an important role for NHEJ-mediated-DSB repair in the survival and genomic stability of induced pluripotent stem cells and emerging haematopoietic progenitors. *Cell Death Differ.*
- Tilgner, K., Neganova, I., Singhapol, C., Saretzki, G., Yousuf Al-Aama, J., Evans, J., Gorbunova, V., Gennery, A., Przyborski, S., Stojkovic, M., *et al.* (2013b). A Human Induced Pluripotent Stem Cell Model of Cernunnos Deficiency Reveals an Important Role for XLF in the Survival of the Primitive Haematopoietic Progenitors. *Stem Cells.*
- Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Timmers, C., Taniguchi, T., Hejna, J., Reifsteck, C., Lucas, L., Bruun, D., Thayer, M., Cox, B., Olson, S., D'Andrea, A.D., *et al.* (2001). Positional cloning of a novel Fanconi anemia gene, FANCD2. *Mol Cell* 7, 241-248.
- Tischkowitz, M., and Dokal, I. (2004). Fanconi anaemia and leukaemia - clinical and molecular aspects. *Br J Haematol* 126, 176-191.
- Tolar, J., Adair, J.E., Antoniou, M., Bartholomae, C.C., Becker, P.S., Blazar, B.R., Bueren, J., Carroll, T., Cavazzana-Calvo, M., Clapp, D.W., *et al.* (2011). Stem cell gene therapy for fanconi anemia: report from the 1st international fanconi anemia gene therapy working group meeting. *Mol Ther* 19, 1193-1198.
- Tolar, J., Becker, P.S., Clapp, D.W., Hanenberg, H., de Heredia, C.D., Kiem, H.P., Navarro, S., Qasba, P., Rio, P., Schmidt, M., *et al.* (2012). Gene therapy for fanconi anemia: one step closer to the clinic. *Hum Gene Ther* 23, 141-144.
- Uematsu, N., Weterings, E., Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P.O., van Gent, D.C., Chen, B.P., and Chen, D.J. (2007). Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 177, 219-229.
- Valeri, A., Martinez, S., Casado, J.A., and Bueren, J.A. (2011). Fanconi anaemia: from a monogenic disease to sporadic cancer. *Clin Transl Oncol* 13, 215-221.
- van der Burg, M., Ijspeert, H., Verkaik, N.S., Turul, T., Wiegant, W.W., Morotomi-Yano, K., Mari, P.O., Tezcan, I., Chen, D.J., Zdzienicka, M.Z., *et al.* (2009). A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B- SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. *J Clin Invest* 119, 91-98.
- Varas, F., Bernad, A., and Bueren, J.A. (1996). Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes into peripheral blood the complete clonal repertoire of hematopoietic precursors residing in the bone marrow of mice. *Blood* 88, 2495-2501.
- Vaz, F., Hanenberg, H., Schuster, B., Barker, K., Wiek, C., Erven, V., Neveling, K., Endt, D., Kesterton, I., Autore, F., *et al.* (2010). Mutation of the RAD51C gene in a Fanconi anemia-like disorder. *Nat Genet* 42, 406-409.
- Velazquez, I., and Alter, B.P. (2004). Androgens and liver tumors: Fanconi's anemia and non-Fanconi's conditions. *Am J Hematol* 77, 257-267.
- Verlinsky, Y., Rechitsky, S., Sharapova, T., Morris, R., Taranissi, M., and Kuliev, A. (2004). Preimplantation Diagnosis for Fanconi Anemia Combined With HLA Matching. *JAMA* 291, 2079-2085.
- Visser, J.W., Bauman, J.G., Mulder, A.H., Eliason, J.F., and de Leeuw, A.M. (1984). Isolation of murine pluripotent hemopoietic stem cells. *J Exp Med* 159, 1576-1590.
- Voipio, H.M., Baneux, P., Gomez de Segura, I.A., Hau, J., and Wolfensohn, S. (2008). Guidelines for the veterinary care of laboratory animals: report of the FELASA/ECLAM/ESLAV Joint Working Group on Veterinary Care. *Lab Anim* 42, 1-11.
- von Schwedler, U., Kornbluth, R.S., and Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6992-6996.
- Wagner, J.E., Eapen, M., MacMillan, M.L., Harris, R.E., Pasquini, R., Boulad, F., Zhang, M.J., and Auerbach, A.D. (2007). Unrelated donor bone marrow transplantation for the treatment of Fanconi anemia. *Blood* 109, 2256-2262.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.
- West, R.B., Yaneva, M., and Lieber, M.R. (1998). Productive and nonproductive complexes of Ku and DNA-dependent protein kinase at DNA termini. *Mol Cell Biol* 18, 5908-5920.
- Whitney, M.A., Royle, G., Low, M.J., Kelly, M.A., Axthelm, M.K., Reifsteck, C., Olson, S., Braun, R.E., Heinrich, M.C., Rathbun, R.K., *et al.* (1996). Germ cell defects and hematopoietic hypersensitivity to gamma-interferon in mice with a targeted disruption of the Fanconi anemia C gene. *Blood* 88, 49-58.
- Wiler, R., Leber, R., Moore, B.B., VanDyk, L.F., Perryman, L.E., and Meek, K. (1995). Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V (D)J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11485-11489.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Williams, D.A. (2008). Sleeping beauty vector system moves toward human trials in the United States. *Mol Ther* 16, 1515-1516.

- Williams, L.A., Davis-Dusenbery, B.N., and Eggan, K.C. (2012). SnapShot: directed differentiation of pluripotent stem cells. *Cell* 149, 1174-1174 e1171.
- Wong, J.C., Alon, N., McKerlie, C., Huang, J.R., Meyn, M.S., and Buchwald, M. (2003). Targeted disruption of exons 1 to 6 of the Fanconi Anemia group A gene leads to growth retardation, strain-specific microphthalmia, meiotic defects and primordial germ cell hypoplasia. *Hum Mol Genet* 12, 2063-2076.
- Woodbine, L., Neal, J.A., Sasi, N.K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W.B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E.G., et al. (2013). PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. *J Clin Invest*.
- Woods, N.B., Muessig, A., Schmidt, M., Flygare, J., Olsson, K., Salmon, P., Trono, D., von Kalle, C., and Karlsson, S. (2003). Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis. *Blood* 101, 1284-1289.
- Yahata, T., Takanashi, T., Muguruma, Y., Ibrahim, A.A., Matsuzawa, H., Uno, T., Sheng, Y., Onizuka, M., Ito, M., Kato, S., et al. (2011). Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 118, 2941-2950.
- Yanez-Munoz, R.J., Balaggan, K.S., MacNeil, A., Howe, S.J., Schmidt, M., Smith, A.J., Buch, P., MacLaren, R.E., Anderson, P.N., Barker, S.E., et al. (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nat Med* 12, 348-353.
- Yang, Y., Kuang, Y., Montes De Oca, R., Hays, T., Moreau, L., Lu, N., Seed, B., and D'Andrea, A.D. (2001). Targeted disruption of the murine Fanconi anemia gene, *Fancg/Xrcc9*. *Blood* 98, 3435-3440.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-548.
- Yoo, S., and Dynan, W.S. (1999). Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* 27, 4679-4686.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yuan, J., Wang, J., Crain, K., Fearn, C., Kim, K.A., Hua, K.L., Gregory, P.D., Holmes, M.C., and Torbett, B.E. (2012). Zinc-finger nuclease editing of human *cxcr4* promotes HIV-1 CD4 (+) T cell resistance and enrichment. *Mol Ther* 20, 849-859.
- Yung, S.K., Tilgner, K., Ledran, M.H., Habibollah, S., Neganova, I., Singhapal, C., Saretzki, G., Stojkovic, M., Armstrong, L., Przyborski, S., et al. (2013). Brief report: human pluripotent stem cell models of fanconi anemia deficiency reveal an important role for fanconi anemia proteins in cellular reprogramming and survival of hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 31, 1022-1029.
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6, 363-369.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381-384.